

REKOMBINATIONSVERHALTEN
VON DREI UV-SENSIBLEN
SACCHAROMYCES-DIPLONTEN
IN ABHÄNGIGKEIT VON DER UV-DOSIS
UND VON VERSCHIEDENEN
NACHBEHANDLUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
Doktorwürde

Dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin
vorgelegt von —

SUSANNE KOWALSKI
aus

Leipzig

1975

REKOMBINATIONSVERHALTEN
VON DREI UV-SENSIBLEN
SACCHAROMYCES-DIPLONTEN
IN ABHÄNGIGKEIT VON DER UV-DOSIS
UND VON VERSCHIEDENEN
NACHBEHANDLUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
Doktorwürde

Dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin
vorgelegt von

SUSANNE KOWALSKI
aus
Leipzig



1. Referent: Prof. Dr. W. Laskowski

2. Referent: Prof. Dr. U. Reichert

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.75

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG	1
1.1. Allgemeines	1
1. Kurzer Überblick über bekannte Reparatur- mechanismen	2
2. Reparaturmechanismen bei <i>Saccharomyces</i>	5
1.2. Zur Rekombination und ihrer Induzierbarkeit durch UV	7
1.3. Modellvorstellungen über die UV-induzierte Mutagenese	11
1.4. Problemstellung	12
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1. Stämme	14
2.2. Medien und Puffer	17
2.3. Methoden der Stammreinigung und -überprüfung	18
1. Aufbewahrung und Reinigen von Hefestämmen	18
2. Überprüfung von Eigenschaften	18
2.4. Herstellung neuer Stämme	20
1. Kreuzung von Haplonten und Isolierung der Diplonten	20
2. Sporulation eines Diplonten zur Isolierung von Haplonten mit neuen Genkombinationen	20
2.5. Bestimmung der spontanen mitotischen Rekombi- nations- und der spontanen Mutationshäufigkeit	22
1. Versuchsablauf für die Rekombinations- häufigkeiten	22
2. Versuchsansatz für die Mutationshäufigkeiten	24
2.6. Bestimmung der Überlebensraten, sowie der UV-in- duzierten Rekombinations- und Mutationshäufigkeiten	25
1. Aufnahme von Inaktivierungskurven	25
2. Bestimmung der UV-induzierten mitotischen Rekombinationshäufigkeiten	26
3. Bestimmung der UV-induzierten Mutations- häufigkeiten	27
3. ERGEBNISSE	29
3.1. Einfluß von UV, PhR, LHR und PhR+LHR auf die Überlebenden	29
1. Methodisches	29
2. Einfluß von UV auf die Überlebenden	34
3. Einfluß von UV+PhR auf die Überlebenden	36
4. Einfluß von UV+LHR auf die Überlebenden	39

5. Einfluß von UV+PhR+LHR auf die Überlebenden	43
3.2. Einfluß von UV, PhR, LHR und PhR+LHR auf die Rekombinationsraten	47
1. Methodisches	47
2. Einfluß von UV auf die Rekombinationsraten	52
1. Nachweis der Induktion von Rekombinationsereignissen	52
2. UV-induzierte Rekombinationsraten	54
3. Einfluß von UV+PhR auf die Rekombinationsraten	61
4. Einfluß von UV+LHR auf die Rekombinationsraten	65
5. Einfluß von UV+PhR+LHR auf die Rekombinationsraten	69
3.3. Spontane Rekombinationsraten	74
1. Methodisches	74
2. Die spontanen Rekombinationsraten: Ergebnisse	75
3.4. Einfluß von UV, PhR, LHR und PhR+LHR auf die Mutationsraten	78
1. Methodisches	78
2. Einfluß von UV auf die Mutationsraten	82
1. Nachweis einer Induktion durch UV-Bestrahlung	82
2. Einfluß von UV auf die Mutationsraten	83
3. Einfluß von UV+PhR auf die Mutationsraten	87
4. Einfluß von UV+LHR auf die Mutationsraten	89
5. Einfluß von UV+PhR+LHR auf die Mutationsraten	90
3.5. Spontane Mutationsraten	93
1. Methodisches	93
2. Die spontanen Mutationsraten	93
4. DISKUSSION	94
4.1. Einleitung	94
1. Isogenität der Stämme	95
2. Art und Verteilung der UV-induzierten Schäden	95
3. Reparaturfähigkeit der Zellen und Reparierbarkeit der Schäden	96
4. Rekombination und REC Reparatur	98
5. Zusammenhang von Reparaturprozessen mit der UV-Induktion von Mutanten	99
4.2. Einfluß der rad Gene auf die Reparatur von präletalen Schäden	101
4.3. Einfluß der rad Gene auf UV-induzierte Rekombination	106
1. Intergenische Rekombinanten	106
2. Intragenische Rekombinanten	108
3. Besteht ein Zusammenhang zwischen UV-induzierten inter- und intragenischen Rekombinationsereignissen?	110
4. Einfluß der Nachbehandlungen auf die UV-induzierten Rekombinanten	113

4.4. Einfluß der rad Gene auf die UV-induzierte Mutation	118
4.5. Ist eine Zuordnung der r_1^S und r_2^S Mutationen in eins der bekannten Reparatursysteme möglich?	121
5. ZUSAMMENFASSUNG	124
Literaturverzeichnis	127
Anhang	142



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. EINLEITUNG

1.1. Allgemeines

Die Strahlenbiologie ist ein relativ junges Grenzgebiet der Biologie, Chemie und Physik. Ihre ständig wachsende Bedeutung ist mit der Tatsache eng verknüpft, daß UV und andere Strahlen Zellen und Organismen schädigen oder töten, sowie in ihren Nachkommen Veränderungen hervorrufen können.

Folgende Themenkreise stellen gleichzeitig den Kern und die Zielsetzung strahlenbiologischer Forschung dar: die Bestimmung von

- Art, Ausmaß und Lokalisierung der verursachten Schäden
- den unmittelbaren und langfristigen Wirkungen der Schäden
- eventuell vorhandenen Möglichkeiten der Zellen bzw. Organismen, die Schäden zu beseitigen oder unschädlich zu machen (= Reparaturfähigkeiten) und sich vor den Schäden zu schützen.

Die Wirkungen der UV-Strahlen wurden bisher am besten untersucht. Strahlung der Wellenlänge 254 nm wirkt spezifisch auf Nukleinsäuren und erzeugt dabei hauptsächlich Pyrimidindimere (PP), bei höheren Dosen aber auch "Interstrang-Verknüpfungen" (DNA-DNA cross-links), DNS-Protein-Komplexe und Einzelstrangbrüche. Ein Einfluß von UV auf Proteine und andere Zellbestandteile ist zwar nicht völlig auszuschliessen, kann aber gegenüber der Wirkung auf die Nukleinsäuren (DNS und RNS) vernachlässigt werden. (Zusammenfassende Arbeiten über die durch UV verursachten Schäden: SMITH und HANAWALT 1969, KANAZIR 1969, LATARJET 1972)

PP wirken unmittelbar hemmend auf die DNS-Replikation (SETLOW, SWENSON und CARRIER 1963), auf die RNS- und auf die Proteinbiosynthese (POLLARD und BARONE 1966, LASKOWSKI et al. 1968). Sie können dadurch eine Verzögerung der Mitose (division delay) und den Zelltod verursachen. Es ist denkbar, daß PP eventuell auch direkt oder indirekt an einer Aktivierung oder Inaktivie-

rung von Reparaturprozessen beteiligt sind (HAYNES 1966, SMITH und HANAWALT 1969).

Langfristige Wirkungen lassen sich besonders als Veränderungen des Erbguts (z.B. Mutationen oder Rekombinationsereignisse) erkennen. Diese Veränderungen der DNS sind jedoch eigentlich Sekundäreffekte der $\hat{P}P$, die das Substrat von Reparaturprozessen sind. Solche DNS-Veränderungen (z.B. Basenänderungen, Additionen, Deletionen und z.T. Einzelstrangbrüche) werden wahrscheinlich zum großen Teil durch Reparaturprozesse hervorgerufen.

Den Lebewesen stehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten zur Verfügung, sich gegen die schädigende Wirkung von Strahlung zu "wehren":

- Verhüten des Eindringens der Strahlen in die Zellen, z.B. durch Pigmentbildung (wirksam nur gegen relativ langwellige Strahlung, wie UV)
- "Reparatur" des verursachten Schadens.

Besonders die Reparaturmechanismen sind bezüglich der langfristigen Wirkungen von Bedeutung. Am besten sind sie bislang bei Bakterien, vor allem bei *E. coli*, untersucht.

1.1.1. Kurzer Überblick über bekannte Reparaturmechanismen

Für die Reparatur der $\hat{P}P$ sind mehrere Möglichkeiten denkbar:

- Umkehrung des Vorgangs $P+P \rightarrow \hat{P}P$; also, $\hat{P}P \rightarrow P+P$
- Entfernen der $\hat{P}P$
- Umgehen des $\hat{P}P$ Schadens bei der Replikation.

Tatsächlich sind Reparaturprozesse gefunden worden, die jeweils nach dem einen oder dem anderen Prinzip ablaufen. Im Folgenden sind die bei *E. coli* gefundenen und untersuchten Reparatursysteme schematisch zusammengefaßt.

Photoreaktivierung (PhR)

Dieser Reparaturvorgang ist ein Beispiel für die erste Möglichkeit. PhR benötigt als einziger Reparaturmechanismus sichtbares Licht als Energiequelle. Das PhR-Enzym bindet sich

bereits im Dunkeln an die $\hat{P}\hat{P}$. Treffen Quanten des photoreaktivierenden Lichts ($\lambda \geq 300$ nm) auf einen Enzym-Substrat-Komplex, wird das $\hat{P}\hat{P}$ in situ in P+P zurückgebildet. PhR ist ein Prozeß, durch den der ursprüngliche Zustand der DNS exakt wiederhergestellt wird. (Zusammenfassende Arbeiten: SETLOW 1966, KELLY et al. 1969, SCHUSTER 1969, HARM et al. 1971)

Excision Repair (EXR)

EXR ist ein Beispiel für die zweite Reparaturmöglichkeit, nämlich Entfernen des Schadens. Dieser Prozeß kann im Dunkeln stattfinden, da der hierfür nötige Energiebedarf von der Zelle selbst gedeckt wird. Für EXR werden mehrere Enzymfunktionen beansprucht:

- Endonuklease-Funktion für den Einschnitt in die DNS neben den $\hat{P}\hat{P}$ (= incision)
- Exonuklease-Funktion für das Ausschneiden der $\hat{P}\hat{P}$ zusammen mit benachbarten Basen (= excision)
- Polymerase-Funktion für die Neusynthese an der Stelle des herausgeschnittenen DNS-Stücks; der komplementäre Strang dient als Matrizie (= repair replication)
- Ligase-Funktion für die Verknüpfung des neusynthetisierten Stücks mit dem alten DNS-Strang (= rejoining).

Eine definitive Zuordnung spezifischer Enzyme in das EXR System war bislang bei *E. coli* noch nicht möglich, aber die Reihenfolge der Schritte konnte biochemisch nachgewiesen werden. Teilweise sind Enzymkomplexe mit mehreren Funktionen gefunden worden, so z.B. die Kornberg-Polymerase (SETLOW und KORNBERG 1972) und die λ -Exonuklease (RADDING und CASSUTO 1972). Auch sind für jeden Schritt mehrere Enzyme charakterisiert worden. EXR ist ein relativ exakt ablaufender Prozeß.

Recombination Repair (REC)

Dieser Reparaturmechanismus ist ein Beispiel für die dritte Möglichkeit. REC Reparatur hängt, wie EXR, vom Energiestoffwechsel der Zelle ab (= Dunkelreparatur) und kann außer $\hat{P}\hat{P}$ auch an-

dere Schäden reparieren. Zur REC Reparatur gehören mindestens folgende Schritte:

- Die Replikation eines DNS-Stranges mit $\hat{P}P$ oder anderen Schäden ist durch die REC-Polymerase möglich. Dabei werden unbeschädigte Strecken der DNS "normal" repliziert, während gegenüber den Schäden in dem neuen, komplementären Strang Lücken (= gaps) entstehen.
- Ein rekombinationsähnlicher Vorgang zwischen homologen DNS-Duplices (= Doppelsträngen) bewirkt, daß sowohl der UV-induzierte Schaden als auch die durch Replikation entstandene Lücke schließlich einem intakten (homologen) DNS-Stück gegenüberliegen.
- Die Lücken können nach diesem Vorgang durch Polymerase- und Ligase-Funktionen wieder geschlossen werden; dabei dient das homologe, nun komplementäre DNS-Stück als Template. $\hat{P}P$ und andere Schäden können später u.a. durch EXR entfernt werden.

Die Entstehung der Stranglücken nach der DNS-Replikation wurde biochemisch nachgewiesen. Ebenso konnte das Schliessen dieser Lücken im Zusammenhang mit dem Auftreten rekombinanter DNS-Moleküle gezeigt werden. Es stehen jedoch gerade bei der REC Reparatur noch viele Fragen offen, da die genauen Schrittfolgen sowie die beteiligten Enzyme noch nicht bekannt sind.

(Zusammenfassende Arbeiten für beide Arten von Dunkelreparatur, EXR und REC: HOWARD-FLANDERS 1968, HAYNES et al. 1968, SMITH und HANAWALT 1969, WITKIN 1969, KÖSSLER 1970, SMITH 1971, BEERS et al. 1972.)

Bei *E. coli* sind UV-sensible Mutanten isoliert worden, die in einem oder in mehreren Reparatursystemen defekt sind. Für PhR ist eine Mutante bekannt (phr^- , HARM und HILLEBRANDT 1962); für EXR sind es die uvr^- , pol^- und lig^- Mutanten (HOWARD-FLANDERS und BOYCE 1965; GANESAN und SMITH 1968, 1969; DE LUCIA und CAIRNS 1969; BOYLE, PATTERSON und SETLOW 1970; KANNER und HANAWALT 1970; PAULING und HAMM 1969; GOTTESMAN et al. 1973; SMITH

et al. 1973). Für REC sind die rec^- und exr^- Mutanten isoliert worden (HILL 1965, HOWARD-FLANDERS und BOYCE 1966, HOWARD-FLANDERS 1968, STORM 1971).

1.1.2. Reparaturmechanismen bei Saccharomyces

Bedingt durch methodische Schwierigkeiten in der spezifischen Markierung von Hefe-DNS, konnte die Wirkungsweise von Reparaturmechanismen an diesem Objekt bisher noch nicht biochemisch untersucht werden, sondern nur indirekt (UNRAU et al. 1971) oder biologisch. Dies bedeutet, daß die Beobachtung von Einfach-, besonders aber von Mehrfach-Mutanten, Aufschlüsse über die Zahl, die Art und den eventuellen Zusammenhang von Reparatursystemen geben mußte.

Bei Saccharomyces sind inzwischen 22 Gene als RAD-Gene bezeichnet worden, die im mutierten Zustand eine Sensibilität gegenüber UV-Strahlen verursachen (GAME und COX 1971). Es sind noch mehr Mutanten isoliert worden, die jedoch noch nicht in das System der rad-Gene aufgenommen werden konnten. Die Vielzahl der bislang bekannten rad-Gene, sowie der relativ komplexe Aufbau von Hefechromosomen (im Vergleich zur "nackten" DNS bei Bakterien) lassen vermuten, daß entweder

- die Reparaturmechanismen bei Hefen komplizierter ablaufen,
- mehr und auch andere Reparaturmechanismen bei Hefen vorhanden sind als bei Bakterien, oder
- es sich bei den rad-Genen der Hefen nicht nur um Strukturgene, sondern auch um Regulatorgene handelt.

Photoreaktivierung (PhR)

PhR scheint bei Saccharomyces genauso abzulaufen wie bei E. coli, wie es in vitro Versuche mit Hefe-PhR-Enzym zeigten (RUPERT und HARM 1966). Ähnlich wie bei E. coli ist bei Saccharomyces nur eine phr^- Mutante isoliert worden (RESNICK 1969).

Excision Repair (EXR)

Neuere Versuche von UNRAU et al. (1971), sowie von RESNICK und SETLOW (1972), konnten mit indirekten biochemischen Methoden zeigen, daß EXR auch bei *Saccharomyces* stattfindet. Das biologische Verhalten verschiedener rad-Stämme war allerdings vorher bereits mit dem Verhalten definierter Bakterienstämme verglichen worden. Durch Analogien bezüglich der UV- und Röntgensensibilität, des Mutationsverhaltens und der Wirkung von Nachbehandlungen konnte auf eine defektes EXR-Vermögen geschlossen werden.

Recombination Repair (REC)

Trotz unterschiedlicher Hinweise dafür, daß dieser Reparaturmechanismus bei Hefen existieren müßte, liegen z.Z. noch keine klaren Modellvorstellungen vor. Ein Zusammenhang zwischen Rekombination und Reparatur ist jedoch wahrscheinlich (PARRY und PARRY 1969, HOLLIDAY 1968, FABRE 1970 und 1972).

Häufig wurde bei Hefen nur die meiotische Rekombination¹⁾ untersucht, die scheinbar nicht mit dem Reparaturprozeß gekoppelt ist (SNOW 1967, MOUSTACCHI 1969, ZAKHAROV et al. 1970). Die mitotische Rekombination hingegen, mag gemeinsame Enzyme mit dem Reparaturmechanismus aufweisen (PARRY und COX 1968, HUNNABLE und COX 1971, PARRY und PARRY 1972). HOLLIDAY konnte an *Ustilago* beweisen, daß eine Reparatur im Zusammenhang mit mitotischer Rekombination sogar noch vor der DNS-Replikation stattfinden kann (HOLLIDAY 1971).

(An dieser Stelle soll noch auf eine Arbeit hingewiesen werden, in der die verschiedenen Reparaturmechanismen besonders bei Bakteriophagen, Bakterien und Pilzen, aber auch -- soweit bekannt -- bei höheren Organismen, beschrieben und verglichen werden: RADMAN et al. 1973.)

¹⁾ Meiotische Rekombination findet im Zusammenhang mit einer Reduktionsteilung, mitotische dagegen im Verlauf einer normalen Zellteilung statt.

1.2. Zur Rekombination und ihrer Induzierbarkeit durch UV

Die Rekombination verändert das Erbgut an sich nicht, wie z.B. die Mutation, sondern ändert nur die Verteilung der Erbmerkmale innerhalb des Erbgutes. Daher ist die Rekombination für die Evolution von größter Bedeutung (s. auch RADMAN et al. 1973). Sie ist ein Prozeß, der die Variabilität der Individuen in einer Population erhöht und es ermöglicht, daß getrennt auftretende Mutationen in einer Population durchaus in einem Individuum vereint sein können.

Obwohl Unterschiede zwischen der meiotischen und mitotischen Rekombination bezüglich der Häufigkeit und einer eventuellen Kopplung mit einem Reparatursystem bestehen, gibt es jedoch noch keine Beweise dafür, daß die beiden Prozesse völlig unterschiedlich und unabhängig voneinander ablaufen. Bis heute ist es ebenfalls noch nicht geklärt, wie Rekombinationsvorgänge tatsächlich verlaufen und ob inter- und intragenische Rekombinationsereignisse²⁾ durch einen einzelnen, zwei voneinander unabhängige oder zwei miteinander gekoppelte Mechanismen verursacht werden. Die letztere Möglichkeit erscheint am sinnvollsten. Sie ist Gegenstand des "Aviomore"-Rekombinationsmodells (RADDING 1973). Der Rekombinationsverlauf läßt sich nach diesem Modell folgendermaßen charakterisieren:

- Einleiten des Rekombinationsvorgangs durch Strangbrüche

Es können sowohl Einzel-, wie auch nur geringfügig gegeneinander verschobene Doppelstrangbrüche sein, die durch Rekombinationsenzyme, Replikations- und Reparaturenzyme oder auch zufällig entstehen können.

- Einleitung des Strang austauschs

An der Bruchstelle entsteht ein "aggressiver" Einzelstrang (wahrscheinlich durch Proteine stabilisiert: AL-

²⁾ Intergenische Rekombination findet zwischen ganzen Genen statt und wird häufig als "cross over" bezeichnet. Intragenische Rekombination findet innerhalb eines Gens statt und wird häufig als "Genkonversion" oder "allelic conversion" bezeichnet, besonders wenn es sich um meiotische Vorgänge handelt.

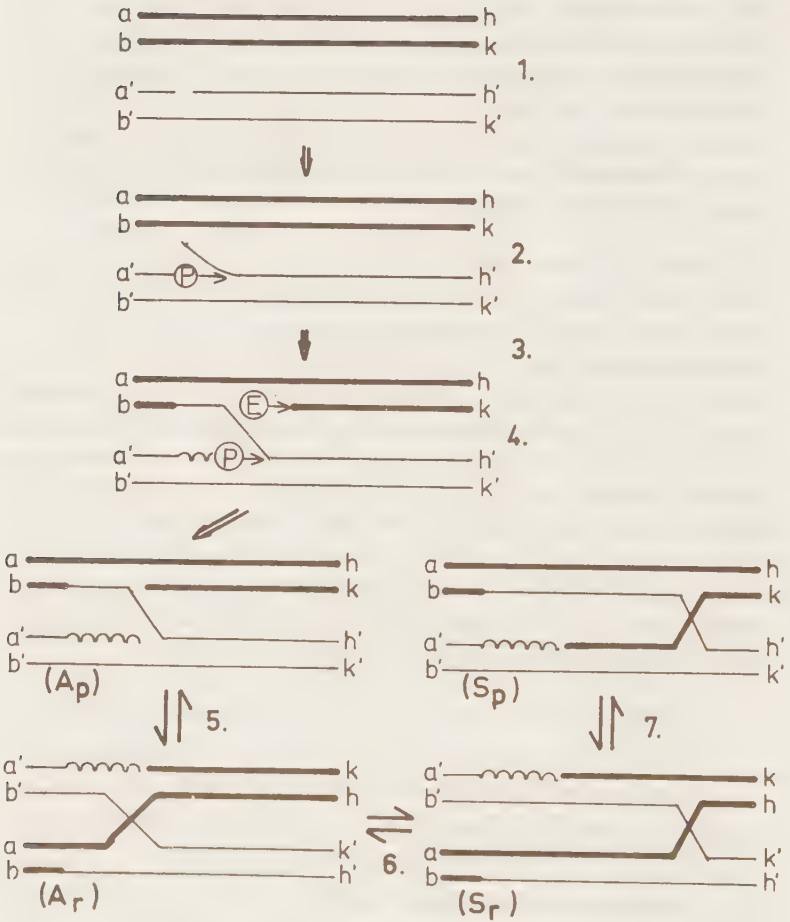


Abb. 1:

Rekombinationsmodell nach MESELSON und RADDING (1975)
 Legende ist auf S. 9.

Legende zu Abb. 1:

1. Einzelstrangbruch in einem homologen Paar von DNS-Doppelsträngen.
2. An dem Einzelstrangbruch wird durch Polymerase-Funktion ($\textcircled{P} \rightarrow$) ein Strangstück "verdrängt" (= strand displacement).
3. Das verdrängte Stück verursacht einen Einzelstrangbruch in dem homologen DNS-Doppelstrang und paart sich dort mit der komplementären Sequenz.
4. Das Einzelstrangstück wird durch die gleichzeitig stattfindenden Prozesse "strand displacement" und "strand assimilation" weiter verdrängt. "Strand assimilation" (= Einbau des Einzelstranges) wird durch eine Exonuklease-Funktion ermöglicht ($\textcircled{E} \rightarrow$) (RADDING u. CASSUTO 1972).
Aus diesem Vorgang entsteht ein asymmetrischer Strangaus-tausch; nur einer der beiden DNS-Doppelstränge enthält Heteroduplex-DNS (s. Struktur A_p).
5. Nachdem der Enzymkomplex dissoziiert, kann die Struktur A_p durch Isomerie in die Struktur A_r übergehen. A_p zeigt eine parentale Anordnung der Außenmarker, A_r eine rekombinante Anordnung der Außenmarker.
6. Die "cross over"-Struktur in A_r kann durch "rotary diffusion" (MESELSON 1972) frei nach rechts oder links wandern. Dadurch wird der Strangaustausch symmetrisch: in beiden Doppelsträngen kann Heteroduplex-DNS entstehen (s. Struktur S_r).
7. Die Struktur S_r kann durch Isomerie in die Struktur S_p übergehen (SIGAL u. ALBERTS 1972). S_r und S_p stellen einen symmetrischen Strangaustausch mit rekombinanter bzw. parentaler Anordnung der Außenmarker dar.
8. Der Rekombinationsvorgang wird dadurch gestoppt, daß in die beiden überkreuzten Stränge "eingeschnitten" wird (= strand cleavage).
9. Heteroduplexbereiche in der DNS können nach Abschluß des Rekombinationsvorganges repariert werden.

BERTS und FREY 1970), der 'anscheinend durch Polymerase- und Exonuklease-Funktionen verlängert wird, während die DNS-Doppelhelix gleichzeitig an derselben Stelle vorübergehend entstabilisiert wird.

- Strang austausch

Der aggressive Einzelstrang dringt in den intakten homologen Doppelstrang ein. Dabei wird der aggressive Einzelstrang durch Endo-Exonuklease-Funktionen in den Doppelstrang eingegliedert. Ein Strang des "gestörten" Doppelstrangs wird degradiert. Entstehende Lücken werden laufend nachsynthetisiert (= branch migration). Durch Rotation um eine gemeinsame Längsachse der beiden äußersten Stränge können diese sich kreuzen. Dieser Kreuzungspunkt kann wiederum durch Rotation an der DNS entlang "wandern" (= rotary diffusion).

- Abschluß des Rekombinationsvorgangs

An der Stelle, an der die fortlaufende, reißverschlußähnliche Exonuklease- und Polymerase-Funktion angehalten wird (z.B. durch die stereochemische Struktur der DNS), muß die übriggebliebene Lücke zwischen zwei Basen durch eine Ligase-Funktion verknüpft werden. Mit entsprechender "Rückwärtsrotation" um die gemeinsame Längsachse entstehen wieder zwei Doppelstränge.

Dieses Modell (s. Abb. 1) ermöglicht einen Zusammenhang zwischen inter- und intragenischer Rekombination, obwohl es ein gleichzeitiges Auftreten der beiden Phänomene nicht fordert. Je nachdem, in wie weit die Rotation der beiden äußersten Stränge mit einer branch migration gekoppelt ist (oder auch nicht), lassen sich mit diesem Modell beliebige Kombinationen von inter- und intragenischen Rekombinationsereignissen entwickeln.

Wenn tatsächlich Einzelstrangbrüche den Rekombinationsvorgang einleiten, ergeben sich für UV-bestrahlte Zellen -- und damit auch für die UV-induzierten Rekombinationsereignisse -- folgende Konsequenzen:

- Einzelstrangbrüche, die nach hohen UV-Dosen auftreten, können Rekombinationsereignisse unmittelbar induzieren.
- Ein defektes Reparatursystem (z.B. EXR) das zwar $\hat{P}\hat{P}$ entfernt, oder auch in der Nähe der $\hat{P}\hat{P}$ einen Einschnitt macht -- aber nicht mehr --, bietet dem Rekombinations-system mehr Lücken und Einzelstrangbrüche als nur die UV-Dosis allein. Dadurch wird die Rekombinationshäufigkeit erhöht.
- Ein funktionsfähiges REC System erhöht ebenfalls die Zahl der Rekombinationsereignisse nach UV-Bestrahlung aufgrund der nach einer Replikationsrunde entstandenen "gaps" gegenüber den $\hat{P}\hat{P}$ (s. 1.1.1.).

1.3. Modellvorstellungen über die UV-induzierte Mutagenese

Auch die Mutagenese ist bei Bakterien bisher gründlicher erforscht als bei Hefen. Der molekulare Mechanismus der Mutagenese ist zwar noch nicht völlig geklärt, aber vor allem die UV-induzierte Mutagenese scheint ein genetisch kontrollierter Vorgang zu sein (MEISTRICH und DRAKE 1972, DRAKE 1973).

Bei Bakterien ist die UV-induzierte Mutagenese wahrscheinlich eng mit einem funktionsfähigen REC System gekoppelt. PhR und EXR sollen hingegen exakt arbeiten, also "fehlerfrei", und stehen anscheinend nicht im Zusammenhang mit der UV-induzierten Mutagenese. (Übersichten über die UV-induzierte Mutagenese: WITKIN 1966, 1967, 1969; BRIDGES 1969; WITKIN und GEORGE 1973)

Der molekulare Mutationsprozeß ist bei Hefen kaum geklärt. RESNICK (1968) konnte jedoch zeigen, daß PhR und EXR auch bei Hefen, entsprechend den Ergebnissen bei Bakterien, weitgehend fehlerfrei arbeiten. Die von LEMONTT isolierten rev-Gene bewirken eine erhöhte UV-Sensibilität sowie eine Reduktion der UV-induzierten Mutationshäufigkeiten (LEMONTT 1970, 1971, 1972). Scheinbar sind die REV-Gene, die im REC System eingeordnet werden (VAN BORSTEL 1974), aktiv an der UV-induzierten Mutagenese beteiligt.

Es bleibt offen, ob

- allein die REV-Gene für die Manifestierung von UV-induzierten Primärschäden verantwortlich sind,
- nebeneinander mehrere unterschiedliche Systeme bestehen, die an der Induktion von Mutationen nach der UV-Bestrahlung beteiligt sind, oder ob
- teilweise gemeinsame oder lose gekoppelte Schritte zwischen den betroffenen Systemen vorhanden sind, z.B. eine enge Kopplung zwischen dem REC Reparatursystem und der UV-induzierten Mutagenese.

1.4. Problemstellung

Das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit ist die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen UV-induzierten mitotischen Rekombinationsereignissen und Reparaturprozessen nach UV-Bestrahlung besteht.

Rekombinationsereignisse eignen sich ebenso wie Mutationsereignisse für biologische Untersuchungen an den Reparaturmechanismen der Zelle. Sie werden durch UV-induzierte Primärschäden mit verursacht und die durch sie veränderte genetische Information ist vererbbar (= langfristige Wirkung). Somit kann das Auftreten von Rekombinanten bzw. Mutanten als indirekter Beweis für vorhandene UV-induzierte Primärschäden und für stattgefundene Reparatur gewertet werden.

Mehrere Möglichkeiten bestehen, einen eventuellen Zusammenhang zwischen mitotischer Rekombination und Reparatur biologisch zu untersuchen, u.a. durch

- a. Beobachtung des Auftretens von mitotischen Rekombinanten in Abhängigkeit von der applizierten UV-Dosis und von der Überlebensrate eines bestrahlten Stammes.
- b. Vergleich von a. bei mehreren Stämmen, die in unterschied-

licher Weise reparaturdefekt sind.

- c. Vergleich von a. mit unterschiedlichen Behandlungen vor oder nach der UV-Bestrahlung, die das eine oder das andere Reparatursystem besonders begünstigen.

In dieser Arbeit wurden alle drei Möglichkeiten angewendet. Das Rekombinationsverhalten von drei diploiden, unterschiedlich strahlensensiblen Stämmen mit einer jeweils für die r_1^s , r_2^s oder $rad2-20$ Mutation homozygoten Kondition wurde mit dem des entsprechenden Wildtypstamms (RAD) verglichen -- jeweils in Abhängigkeit von der applizierten UV-Dosis und der Überlebensrate.

Um Reparaturprozesse spezifisch zu begünstigen, wurde mit sichtbarem Licht (= Photoreaktivierung) und Pufferhaltung im Dunkeln ohne Nährstoffangebot (= liquid holding; für EXR, REC) nachbehandelt.

Zur Absicherung der UV-induzierten Rekombinationshäufigkeiten sind zusätzlich die UV-induzierten Mutationshäufigkeiten der Diplonten ermittelt worden. Für die Bestimmung der UV-induzierten Mutationsraten wurden geeignete homozygote Stämme hergestellt und mit diesen Versuche parallel zu den Rekombinationsversuchen (einschließlich der Nachbehandlungen) durchgeführt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Stämme

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Sie sind aus auxotroph-strahlensensiblen Haplonten entstanden, deren Herstellung bereits ausführlich beschrieben wurde (KOWALKSI 1971).

Die auxotrophen Marker *ade2-x*, *his3*, *lys2* und *ura1* entstammen ursprünglich den Sammlungen von H. Roman und R. K. Mortimer. Das *ade2-x* Gen ist daher mit aller Wahrscheinlichkeit identisch mit der ochre-supprimierbaren *ade2-1* Mutation (LASKOWSKI, persönliche Mitteilung; ROMAN 1956, HAWTHORNE und MORTIMER 1968), mit der es auch nicht komplementiert (KOWALKSI, unveröffentlicht). *Lys2* ist zusammen mit *ade2-x* super-supprimierbar (ECKARDT 1974) und ebenfalls mit *his3* (ECKARDT, persönliche Mitteilung). *Ade2-x* und *his3* scheinen jedoch nicht gemeinsam supprimierbar zu sein. Das *ade2-y* Allel wurde von U. Reichert isoliert (REICHERT 1968) und unterscheidet sich von dem *ade2-x* Allel besonders durch eine sehr niedrige Rückmutationshäufigkeit (ECKARDT, unveröffentlicht).

Die verwendeten strahlensensiblen Hefen wurden von W. Laskowski (LASKOWSKI et al. 1968) und D. Auerbeck (AUERBECK et al. 1970) isoliert und beschrieben. Durch Kreuzungsversuche gelang es, eine dieser Mutationen in das internationale *rad*-System als *rad2-20* einzuordnen (GAME und COX 1971). 22 Mutationen, die bei *Saccharomyces* eine erhöhte Strahlensensibilität gegenüber UV verursachen, werden nach diesem System als *rad* Gene bezeichnet und nummeriert. Bei den anderen Mutationen konnten bisher keine eindeutigen Kreuzungsergebnisse erzielt werden, sodaß diese als r_1^S und r_2^S bezeichnet werden. Inzwischen konnten Untersuchungen von UNRAU et al. (1971) sowie von RESNICK und SETLOW (1972) zeigen, daß die *rad2-20* Mutation das EXR System betrifft. Für die r_1^S und r_2^S Mutationen ist noch keine Zuordnung in eins der bekannten Reparatursysteme möglich. Trotzdem sind sie im Folgenden auch in die allgemeine Bezeichnung "rad Gene" bzw. "rad Stäm-

Stammnummer	Genotyp	Phänotyp	Bezeichnung in dieser Arbeit
für die Rekombinationsversuche:			
2126	$\underline{a} \frac{ade2-x + his3}{+ ade2-y} + \frac{lys2}{lys2} \frac{ura1}{ura1} \frac{RAD}{RAD}$	ade HIS lys ura RAD	RAD Diplont
2124	$\underline{a} \frac{ade2-x + his3}{+ ade2-y} + \frac{lys2}{lys2} \frac{ura1}{ura1} \frac{r_1^s}{r_1^s}$	ade HIS lys ura rad	r_1^s Diplont
2125	$\underline{a} \frac{ade2-x + his3}{+ ade2-y} + \frac{lys2}{lys2} \frac{ura1}{ura1} \frac{r_2^s}{r_2^s}$	ade HIS lys ura rad	r_2^s Diplont
2130	$\underline{a} \frac{ade2-x + his3}{+ ade2-y} + \frac{lys2}{lys2} \frac{ura1}{ura1} \frac{rad2-20}{rad2-20}$	ade HIS lys ura rad	rad2-20 Diplont
für die Mutationsversuche:			
adex-h	$\underline{a} \frac{ade2-x + his3}{ade2-x + his3} \frac{lys2}{lys2} \frac{RAD}{RAD}$	ade his lys RAD	h-RAD Diplont
2110-h	$\underline{a} \frac{ade2-x + his3}{ade2-x + his3} \frac{lys2}{lys2} \frac{r_1^s}{r_1^s}$	ade his lys rad	$h-r_1^s$ Diplont
2121-h	$\underline{a} \frac{ade2-x + his3}{ade2-x + his3} \frac{lys2}{lys2} \frac{r_2^s}{r_2^s}$	ade his lys rad	$h-r_2^s$ Diplont
2105-h	$\underline{a} \frac{ade2-x + his3}{ade2-x + his3} \frac{lys2}{lys2} \frac{rad2-20}{rad2-20}$	ade his lys rad	h-rad2-20 Diplont

Tab. 1:

Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Diplonten. Die Genbezeichnungen entsprechen den Richtlinien des Yeast Genetics Supplement to Microbial Genetics Bulletin (1969).

me" mit einbezogen.

Durch die *ade2*-Mutation sind die verwendeten Stämme alle rot gefärbt. Ihnen fehlt die Information zur Synthese von 5-Amino-4-imidazol-carbonsäure (CAIR) des intakten ADE2 Gens (FISHER 1969), was eine Anhäufung von 5-Amino-imidazol-ribotid (AIR) bewirkt, das zu einem roten Pigment kondensieren kann. (Zusammenfassende Darstellung bei REICHERT 1968). Diese Rotfärbung eignet sich besonders gut für die Erkennung von intragenischen Rekombinationsereignissen, da der ADE2 Phänotyp weiße Kolonien und Sektoren zur Folge hat.

Ein hoher spontaner Anteil atmungsdefekter Zellen (10-30%) trat in jedem Diplonten auf. Bei dem r_2^S Diplonten waren es sogar 50%. Eventuell besteht ein Zusammenhang zwischen der Adeninbedürftigkeit und dem hohen Anteil atmungsdefekter Zellen (MOUSTACCHI 1971), denn nur 1-5% atmungsdefekte Zellen sind in Hefekulturen normal (KRAEPLIN 1967). Dieser hohe Anteil ließ sich jedoch weder durch Kreuzungen, Neuisolierungen aus atmungskompetenten Zellen, noch durch Vorkulturen auf selektiven Nährmedien (z.B. Glyzerinmedium) nennenswert reduzieren. Atmungsdefekte Zellen bilden trotz der *ade2* Mutation weiße Kolonien und Sektoren, sodaß die Färbung eines Stammes nicht als einziges Merkmal für die Erkennung von intragenischen Rekombinationsereignissen verwendet werden konnte. Aus diesem Grund wurde lediglich die Prototrophie als Merkmal benutzt, um intragenische Rekombinationsereignisse zu erfassen (s. auch 2.5, 2.6 und 3.2.1).

Alle Stämme zeigten ein homogenes Zell- und Koloniebild. Eine Ausnahme bildete der r_2^S Diplont, der stark klumpt. Das Klumpen konnte aber bei diesem Stamm weder durch Reinigung, noch durch veränderte Vorkulturbedingungen beseitigt werden; es trat immer wieder auf.

Bei der Herstellung der auxotroph-strahlensensiblen Haplonten hatte es sich gezeigt, daß ein Zusammentreffen der Bedürfnisse für Adenin und Uracil in hohem Maße Letalität verursachte (KOWALSKI 1971). Daher wurde beim Zusammenkreuzen

der h-Diplonten für die Mutationsversuche (s. Tab. 1) auf die Uracilbedürftigkeit verzichtet.

2.2. Medien und Puffer

Für die An- und Aufzucht der Hefen, sowie für ihre Untersuchung, wurden folgende Nährmedien verwendet:

- a. VM (= Vollmedium): u.a. für die Aufbewahrung und Anzucht

1% Yeast Extract (Difco)
1% Pepton (Merck)
2% Glukose
2% Bacto Agar (Difco)

- b. GM (= Glycerinmedium): für die Überprüfung der Atmungs-
fähigkeit der Zellen; Atmungsdefekte Zellen können
Glyzerin nicht wie Glukose vergären und wachsen auf
diesem Medium nicht auf.

wie a., jedoch mit 2% Glyzerin statt Glukose

- c. MM (= synthetisches Minimalmedium)

0.67% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (Difco)
2% Glukose
2% Bacto Agar (Difco)

und folgende Zusätze in der angegebenen Endkon-
zentration:

Adenin	10 mg/l	Lysin	50 mg/l
Histidin	10 mg/l	Uracil	10 mg/l

- d. Mangelmedien: für die Überprüfung von Bedürfnigkeiten;
wie c., nur fehlt jeweils einer der Zusätze. So ist
MM-Ade ein MM ohne Adenin. In dieser Arbeit werden
die Mangelmedien als MM-Ade, MM-His bzw. MM-Lys
bezeichnet.

- e. Praesporulationsmedium (nach MCCLARY et al. 1959):

2% Glukose
0.2% Ammoniumsulfat
0.2% Kaliumdihydrogenphosphat
0.5% Yeast Extract (Difco)
2% Bacto Agar (Difco)

Dieses Medium sollte vor Gebrauch mindestens 7 Tage
alt sein.

f. Sporulationsmedium (nach M^CCLARY, verändert):

0.1% Glukose
0.82% Kaliumazetat
0.25% Yeast Extract (Difco)
0.1864% Kaliumchlorid
0.035% Magnesiumsulfat

Dieses Medium sollte nach Möglichkeit immer frisch hergestellt werden.

MM und die Mangelmedien werden 15 min. bei 115° C autoklaviert, alle anderen Medien 15 min. bei 123° C. Für flüssige Medien entfällt der Agarzusatz.

Als Puffer wurde 0.05 m KH_2PO_4 mit pH 4.8 verwendet.

2.3. Methoden der Stammreinigung und -überprüfung

2.3.1. Aufbewahrung und Reinigen von Hefestämmen

Die Hefestämme werden in Schrägagarröhrchen auf VM bei 4° C aufbewahrt. Alle 3-6 Monate werden sie ungeimpft, um eine Anreicherung von atmungsdefekten Zellen zu verhindern.

Von inhomogenen oder verunreinigten Stämmen werden Verdünnungsausstriche auf VM (oder auch auf selektiven Medien wie GM) angefertigt. Mindestens 10 bis 20 Einzelkolonien werden aus dem Verdünnungsausstrich abgeimpft, angezogen, im Zellbild, Koloniebild und allen notwendigen Eigenschaften erst qualitativ und dann quantitativ untersucht. Diejenigen Kolonien mit den gewünschten Eigenschaften werden gemischt. Das Gemisch wird nochmal auf sämtliche Merkmale überprüft. Hat das Kolonienmisch alle ursprünglichen Eigenschaften und ist es homogen, wird es als gereinigter Stamm in die Versuche aufgenommen.

2.3.2. Überprüfung von Eigenschaften

2.3.2.1. Paarungstypstest

Ein Stamm unbekannten Paarungstyps (PT) wird mit einem α bzw. $\times$ Haplonten auf einer VM Platte oder in VM Flüssigkultur zusammengebracht. Da nur Haplonten entgegengesetzten PT mitei-

inander verschmelzen, läßt sich der PT durch das Auftreten von Zygoten ermitteln. (Sind z.B. mit dem a Haplonten nach 3-8 h Zygoten mikroskopisch sichtbar, hat der Teststamm den PT α .)

2.3.2.2. Auxotrophien und Atmungsfähigkeit

Bedürftigkeiten und Atmungsfähigkeit eines Stammes können qualitativ oder quantitativ überprüft werden. Die qualitative Überprüfung wird durch Überstempeln oder Verdünnungsausstrich auf entsprechenden selektiven Nährböden durchgeführt. Die quantitative Überprüfung erfolgt durch Ausplattierung einer Zellsuspension bekannten Titors auf selektive und nicht-selektive Medien. So werden Stämme z.B. auf Mangelmedien und MM gegeben, um die Bedürftigkeit zu prüfen.

Für eine quantitative Überprüfung der Atmungsfähigkeit ist eine Parallelausplattierung auf VM und GM nötig. Das GM induziert keine Atmungsdefizienz, wie z.B. ein Medium mit Na-Laktat (ECKARDT, unveröffentlicht). Somit sind die Koloniezahlen auf VM und GM vergleichbar. Liegt bereits eine VM Platte mit einer zählbaren Koloniemenge vor, genügt es, diese auf GM zu überstempeln, um ebenfalls eine quantitative Aussage machen zu können.

2.3.2.3. Überprüfung der UV-Sensibilität

a. Bestrahlungsbedingungen

Für die UV-Bestrahlungen wurde eine Quecksilber-Niederdrucklampe HNS 12 (Osram) benutzt, die zu 78% Licht der Wellenlänge 254 nm, 9% der Wellenlänge 185 nm und die restlichen 13% Licht im Wellenlängenbereich 280-450 ausstrahlt. Bei einem Abstand von 42 cm zwischen der UV-Quelle und der betrahlten Oberfläche liegt eine Dosisrate (gemessen mit einem Quantenflußmesser nach SCHAAR-SCHMIDT, 1970) von $4 \text{ erg mm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ an der bestrahlten Oberfläche vor. Die Dosis wurde nur durch Veränderung der Bestrahlungszeit, nicht aber durch Veränderung der Bestrahlungsintensität, variiert.

b. Strahlenschnelltest (nach LASKOWSKI et al. 1968 und AVERBECK 1970)

4-6 Proben der zu untersuchenden Stämme werden in Sektoren auf eine Platte geimpft und durch eine Pipette mit wenig Puffer (< 0.05 ml) möglichst gleichmäßig innerhalb des jeweiligen Sektors ausgestrichen. Vor der Bestrahlung wird eine Bleibblende über die Plattenmitte gehängt, damit keinerlei Strahlung die Zellen unter dieser Fläche erreicht.

Im Strahlenschnelltest werden Haplonten mit 120 erg mm^{-2} , Diplonten mit 240 erg mm^{-2} bestrahlt. Nach 24 h Wachstum bei 30° C lassen sich die rad Gene bei den Haplonten und Diplonten wie folgt unterscheiden:

- rad2-20 Stämme sind außerhalb der Bleibblende völlig abgetötet
- r_1^S und r_2^S Stämme sind außerhalb der Bleibblende zu ca. 50% abgetötet
- RAD Stämme lassen keinen Unterschied zwischen dem bestrahlten und unbestrahlten Bereich erkennen.

c. Quantitative Überprüfung der UV-Sensibilität

Die quantitative Überprüfung erfolgt durch die Aufnahme von Inaktivierungskurven (= DEK, s. 2.6).

2.4. Herstellung neuer Stämme

2.4.1. Kreuzung von Haplonten und Isolierung der Diplonten

Werden Haplonten mit unterschiedlichem PT in flüssigem VM zusammengebracht und diese Suspension unter guter Belüftung bei 30° C geschüttelt, sind nach 2-4 h, spätestens aber nach 8 h, Zygoten mikroskopisch sichtbar. Von den Zygoten knospen die diploiden Zellen ab. Nach 24 h können mehrere Verdünnungsausstriche angefertigt werden, in denen die diploiden Zellen wesentlich schneller zu sichtbaren Kolonien heranwachsen als die haploiden. Die diploiden Kolonien werden abgeimpft und weiter untersucht.

2.4.2. Sporulation eines Diplonten zur Isolierung von Haplonten mit neuen Genkombinationen

Bei $\alpha\alpha$ Diplonten läßt sich die Meiose durch Veränderung des

Nährstoffangebots induzieren. Für den Sporulationsansatz werden diploide Hefezellen erst für kurze Zeit (8-24 h) auf einem reichhaltigen Nährboden (= Praesporulationsmedium) bei 30° C angezüchtet. Die Zellen werden dann mit Puffer abgespült, abzentrifugiert, 2-mal in Puffer gewaschen und anschließend in einem nährstoffarmen Medium (= Sporulationsmedium) unter guter Belüftung (10 ml Medium in einem 100 ml Erlenmeyerkolben) bei 30° C geschüttelt. Nach 3-5 Tagen sind Asci mikroskopisch erkennbar.

Für die Isolierung von Haplonten müssen die haploiden Sporen aus dem Ascusverband getrennt werden. Sie verschmelzen sonst bereits innerhalb der Ascuswand zu diploiden Zellen. Haploide Sporen können durch Mikromanipulation (für genetische Analysen, Tetradenanalyse) oder durch die Sporenmassenisolierung einzeln erhalten werden. Sind nur wenige Asci entstanden, die zudem nur 2 oder 3 Sporen enthalten, ist eine Tetradenanalyse nicht sinnvoll. Dann kann die Methode zur Sporenmassenisolierung nach EMEIS und GUTZ (1958) angewendet werden. Mit dieser Methode können die haploiden Sporen voneinander getrennt, aber nicht mehr einem Ascusverband zugeordnet werden.

Versuchsablauf bei der Sporenmassenisolierung:

- Der Sporulationsansatz wird 2-mal mit Puffer gewaschen, abzentrifugiert und in 3 ml Puffer aufgenommen.
- Diese Suspension wird mit 1.5 ml einer Schnekenenzym-lösung (Suc digestif d'Helix pomatia, L'Industrie Biologique Francaise, Gennevilliers-Seine; 1:3 in Puffer verdünnt) versetzt und 12 h bei 30° C geschüttelt.
- Die Suspension wird dann mit 5 ml Puffer versetzt und abzentrifugiert. Dem Zentrifugat werden 4 ml Tween 80 Lösung (1:200 in Puffer verdünnt) hinzugefügt. Das Gemisch wird kräftig geschüttelt und abzentrifugiert.
- Um die Sporen voneinander zu trennen, wird das Zentrifugat nochmals mit 4 ml Tween 80 Lösung versetzt, aufgerührt und 45 sec. mit Ultraschall behandelt. (Die Ultra-

schallbehandlung wurde mit einem BRANSON-Ultraschall-Desintegrator (Sonifier S 75) bei der Intensität 4 ohne Kühlung durchgeführt.)

- Für die Trennung der lipophilen Sporen von den lipophoben vegetativen Zellen wird die Suspension mit 2 ml Paraffinöl versetzt, kräftig geschüttelt und abzentrifugiert.
- Die überstehende Ölschicht wird in einen 50 ml Erlenmeyerkolben pipettiert; dann werden 2 ml Tween 80 Lösung und 2 ml Paraffinöl hinzugegeben. Das Gemisch wird kräftig geschüttelt und zentrifugiert.
- 0.1 ml des Ölüberstandes wird auf eine Platte pipettiert und mit einem Glasspatel gleichmäßig verstrichen. Anschließend wird der Spatel über 2-3 weitere Platten geführt.

Die Platten werden 3-5 Tage bei 30° C bebrütet. Danach können die haploiden Klone abgeimpft und weiterkultiviert werden.

2.5. Bestimmung der spontanen mitotischen Rekombinations- und der spontanen Mutationshäufigkeit.

Für die Bestimmung der spontanen mitotischen Rekombinations- bzw. der spontanen Mutationshäufigkeiten wurde der Fluktuations-test von LURIA und DELBRÜCK (1943) angewendet.

2.5.1. Versuchsablauf für die Rekombinationshäufigkeiten

Anzucht der Stämme:

- Vorkultur I: 1 oder mehrere Röhrchen mit 5 ml flüssigem VM werden pro Stamm mit einer Impföse Zellen aus den Dauerkulturen beimpft und 14-16 h bei 30° C geschüttelt.
- Vorkultur II: 2-10 VM Platten je Stamm werden mit 0.5 ml der Suspension von Vorkultur I beimpft. Die Suspension wird dabei mit der Pipette gleichmäßig auf der Platte verteilt. Die Platten werden 5-7 Tage bei 30°C bebrütet,

um einen hohen Teil von Einzelzellen in der stationären Phase zu gewährleisten.

Suspensionsgewinnung

- Die Zellen von Vorkultur II werden mit 10 ml Puffer pro Platte in je 1 Zentrifugenglas abgespült und 3 min bei 3000 Upm (Christ Zentrifuge UJ 1) abzentrifugiert.
- Das Zentrifugat wird 2-mal gewaschen (d.h., in 5 ml Puffer aufgenommen, gut geschüttelt und anschliessend 3 min bei 3000 Upm abzentrifugiert).
- Das gewaschene Zentrifugat wird in 9 ml Puffer aufgenommen, gut geschüttelt und 2.5 min bei 1000 Upm fraktioniert. Die oberen 4 ml können als Suspension von Einzelzellen abpipettiert werden.
- Titerbestimmung der fraktionierten Suspension mit einer BÜRKER-TÜRK Zählkammer.
- Vorverdünnen der fraktionierten Suspension auf einen Titer von 10^6 Zellen (= Z)/ 0.1 ml.

Versuchsansatz

- Von 44 Zentrifugengläschen mit je 1 ml flüssigem VM werden 20 mit 5×10^1 Z/ 0.1 ml und
24 mit 1×10^4 Z/ 0.1 ml beimpft.
Gleichzeitig werden 5 VM Platten mit 10^2 Z und 5 MM-Ade Platten mit 1×10^4 Z als Kontrollplatten beimpft und 3-4 Tage bei 30° C bebrütet.
- Die 44 Zentrifugengläser werden 12 h unter guter Belüftung bei 30° C geschüttelt.
- Nach dem Wachstum werden die Zellen in allen 44 Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert. Die Zellen in den 20 Röhrchen mit niedrigem Animpftiter werden in 0.1 ml Puffer aufgenommen und quantitativ auf je 1 VM Platte gegeben. Die Zellen in den anderen Röhrchen werden erst 3-mal gewaschen, abzentrifugiert und anschliessend in 0.1 ml Puffer aufgenommen. Der Inhalt von 20 dieser

Röhrchen wird quantitativ auf MM-Ade Platten gegeben. Zu den restlichen 4 Röhrchen werden 4.9 ml Puffer hinzugefügt und der Titer bestimmt.

- Die 20 VM und 20 MM-Ade Platten werden 3-4 Tage bei 30° C bebrütet.

Auswertung

- Auf allen Platten wurde die Zahl der makroskopisch sichtbaren Kolonien bestimmt, wobei die Koloniezahl auf MM-Ade als Zahl der intragenischen Rekombinanten gewertet wurde.
- VM Platten wurden anschliessend auf je eine MM und eine MM-His Platte gestempelt und diese 1-2 Tage bei 30° C bebrütet.
- Kolonien, halbe oder viertel Sektoren die auf MM, nicht aber auf MM-His aufwuchsen, wurden als intergenische Rekombinanten gewertet.

2.5.2. Versuchsablauf für die Mutationshäufigkeiten

Anzucht der Stämme und

Suspensionsgewinnung wie bei 2.5.1.

Versuchsansatz

- 44 Zentrifugengläser mit je 1 ml flüssigem VM werden mit 1×10^4 Z/ 0.1 ml beimpft und je nach Stamm 16-19 h bei 30° C unter guter Belüftung geschüttelt.
- Von der Ausgangssuspension (1×10^6 Z/ 0.1 ml) werden 3 MM Platten mit je 10^2 Z sowie je 5 Mangelmediumplatten mit 1×10^6 Z als Kontrolle ausplattiert und bei 30° C bebrütet.
- Nach dem Wachstum werden die Zellen in allen 44 Röhrchen 3-mal gewaschen, abzentrifugiert und in 0.1 ml Puffer aufgenommen.
- 20 Röhrchen werden quantitativ auf je 1 Platte MM-Ade, 20 Röhrchen ebenso auf je eine Platte MM-His gegeben.

Die übrigen 4 Röhrchen werden mit 4.9 ml Puffer aufgefüllt und für die Titerbestimmung verwendet.

- Alle Mangelmedien werden 2 Wochen bei 30° C bebrütet, MM Platten nur 3-4 Tage.

Auswertung

Auf allen Platten wurde nach der entsprechenden Inkubationszeit die Zahl der makroskopisch sichtbaren Kolonien ermittelt. Nach einer Wachstumszeit von 2 Wochen gab es auf den Mangelmedien kein weiteres Restwachstum.

2.6. Bestimmung der Überlebensraten, sowie der UV-induzierten mitotischen Rekombinationsraten und der UV-induzierten Mutationshäufigkeiten.

Die Bestimmung der Überlebensraten nach UV-Bestrahlung ist der methodische Ansatz für die Aufnahme von Inaktivierungskurven. Durch geringfügige Veränderungen, z.B. durch die Verwendung anderer Nährmedien, kann diese Methode ebenso für die Ermittlung von UV-induzierten Rekombinations- oder Mutationshäufigkeiten angewendet werden.

2.6.1. Aufnahme von Inaktivierungskurven

Anzucht der Stämme und
Suspensionsgewinnung wie bei 2.5.1.

Versuchsansatz

- UV-Bestrahlungen

In allen Bestrahlungsversuchen werden für alle UV-Dosen Suspensionen mit einer Zelldichte von 10^6 Z/ 0.1 ml bestrahlt. Bei einer konstanten Entfernung zwischen der bestrahlten Oberfläche und der UV-Quelle (42 cm), wurde die UV-Dosis durch Veränderung der Bestrahlungsdauer, nicht aber durch Veränderung der Bestrahlungsintensität variiert.

- Nachbehandlungen nach der UV-Bestrahlung

Photoreaktivierung (PhR):

Für PhR wurde eine Leuchtstoffröhre (Osram L20/W70) verwendet, die zum größten Teil Licht der Wellenlängen 350-560 nm ausstrahlt. Alle Suspensionen (mit 10^6 Z pro 0.1 ml) werden 45 min lang unter Rühren bei 30° C in einem Abstand von 6 cm mit dem photoreaktivierenden Licht behandelt. Inaktivierende Wellenlängen des nahen UV-Bereichs wurden mit einer Folie (MYLAR 500W/2 von Dupont; durchlässig ab 390 nm) zwischen der Leuchtstoffröhre und der Suspension weggefiltert.

Liquid-Holding-Recovery (LHR):

Für LHR werden die Suspensionen (mit 10^6 Z/ 0.1 ml) in Zentrifugengläschen 5 Tage lang im Dunkeln bei 30° C stehengelassen.

Photoreaktivierung und Liquid-Holding (PhR + LHR):

Für die kombinierte Nachbehandlung werden die Suspensionen erst mit photoreaktivierendem Licht behandelt (s.o.) und anschliessend 5 Tage lang bei 30° C im Dunkeln stehengelassen (s.o.).

- Ausplattierung

Die Suspensionen werden unmittelbar vor dem Ausplattieren auf VM oder MM so verdünnt, daß etwa 10^2 Kolonien pro Platte aufwachsen.

Auswertung

Die Zahl der makroskopisch sichtbaren Kolonien wurde nach einer Inkubationszeit von 3-5 Tagen bei 30° C bestimmt.

2.6.2. Bestimmung der UV-induzierten mitotischen Rekombinationshäufigkeiten.

Anzucht der Stämme und

Suspensionsgewinnung wie bei 2.5.1.

Versuchsansatz wie bei 2.6.1.

Für eine Bestimmung der UV-induzierten Rekombinationsraten werden die Zellen so auf VM und MM-Ade Platten gegeben, daß etwa 10^2 Kolonien nach 3 Tagen Wachstum bei 30°C pro Platte gebildet werden.

Auswertung

- Auf allen Platten wurde die Zahl der makroskopisch sichtbaren Kolonien bestimmt. Kolonien, die auf den MM-Ade Platten gewachsen waren, wurden als intragenische Rekombinanten gezählt.
- Die Kolonien auf den VM Platten wurden anschliessend auf je eine MM und eine MM-His Platte überstempelt und 1-2 Tage bei 30° bebrütet.
- Als intergenische Rekombinanten wurden dann diejenigen Kolonien, viertel oder halbe Sektoren gewertet, die auf MM, aber nicht auf MM-His gewachsen waren.

2.6.3. Bestimmung der UV-induzierten Mutationshäufigkeiten

Anzucht der Stämme und

Suspensionsgewinnung wie bei 2.5.1.

Versuchsansatz wie bei 2.6.1.

Die Suspensionen werden unverdünnt auf die Mangelmedien (MM-Ade und MM-His) gegeben, um die Mutanten zu erfassen. Vor dem Ausplattieren auf MM, um die zugehörige Überlebensrate zu bestimmen, werden die Suspensionen so verdünnt, daß etwa 10^2 Kolonien nach 3-4 Tagen entstehen.

Auswertung wie bei 2.5.2.

Eine zusammenfassende Übersicht des Versuchsablaufs bei Bestrahlungsexperimenten ist in Abb. 2. dargestellt.

Die UV-Bestrahlungen, sowie sämtliche Nachbehandlungen und Manipulationen (außer PhR) wurden bei Gelblicht oder im Dunkeln durchgeführt, um unerwünschte Photoreaktivierung zu verhindern.

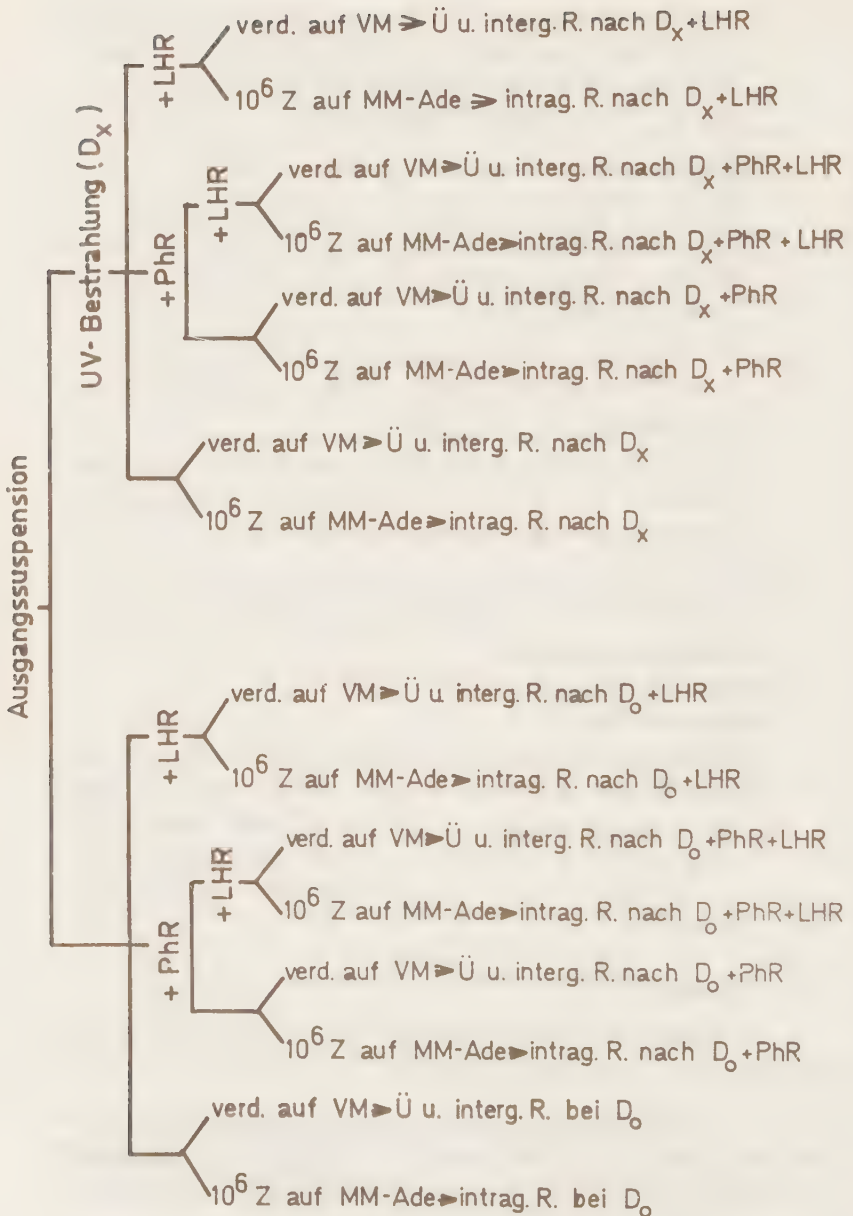


Abb. 2:
Versuchsschema für die Bestrahlungsexperimente

3. ERGEBNISSE

3.1. Einfluß von UV, PhR, LHR und PhR+LHR auf die Überlebenden

3.1.1. Methodisches

Durch die hier geschilderten Bestrahlungsversuche soll die Wirkung von UV-Strahlen verschiedener Dosis auf mehrere unterschiedlich UV-sensible Hefestämme erfaßt werden.

Untersuchungen von HAEFNER (1965) zeigten, daß Zelldichten größer als 10^5 Z/0.1 ml deutliche Abschattungseffekte bei UV-Bestrahlungen verursachen. Stämme, die sehr UV-sensibel sind, wie z.B. der rad2-20 Haplont, zeigen nach YASUI (persönliche Mitteilung) bereits ab 10^4 Z/0.1 ml Abschattungseffekte. Eigene Vorversuche weisen auf stammspezifische Wirkungen der Zelldichte hin. Bei dem r_1^S Diplonten sind Suspensionen mit niedrigem Titer (5×10^4 Z/0.1 ml) in allen untersuchten UV-Dosen resistenter als jene mit hohem Titer (10^6 Z/0.1 ml). (Abb. 3). Für den r_2^S Diplonten trifft dies nur in niedrigen Dosisbereichen zu, wäh-

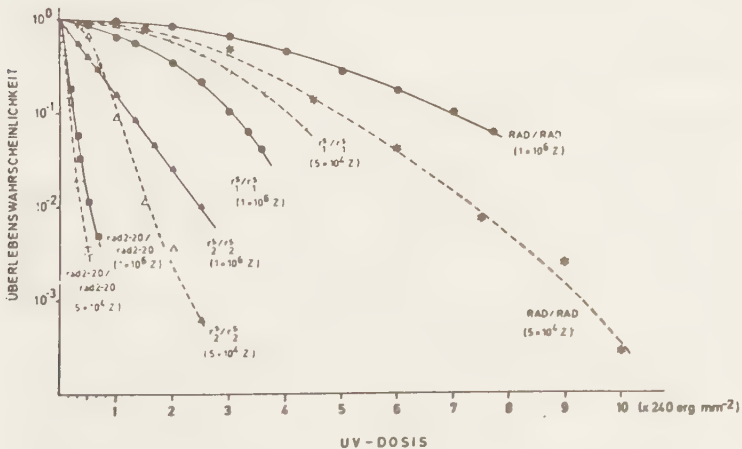


Abb. 3:

Einfluß der Zelldichte auf die UV-Inaktivierung der RAD, r_1^S , r_2^S und rad2-20 Diplonten. (Jeder Punkt entspricht einem experimentell ermittelten Wert.)

rend die "dünnen" Suspensionen bei dem RAD und dem rad2-20 Diplonten in allen Dosisbereichen sensibler sind als die dichteren. Möglicherweise sind Stoffwechselprodukte, die von den Zellen in den Puffer abgeschieden werden, u.a. für solche Effekte verantwortlich (UMLAUF, LOCHMANN und STEIN 1971). Über die Wirkung solcher Faktoren ist jedoch noch nichts bekannt. Es erschien sinnvoll, alle Bestrahlungsversuche mit dem gleichen Zelltitert durchzuführen, um möglichst einheitliche Versuchsbedingungen zu erhalten. Ein Zelltiter von 1×10^6 Z/O.1 ml ist der niedrigste, der für alle Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausreicht.

Zur Dauer der Nachbehandlungen:

- Photoreaktivierung (PhR):

An dem rad2-20 Haplonten konnte YASUI (unveröffentlicht) zeigen, daß nach höheren UV-Dosen länger photoreaktiviert werden muß als nach niedrigen, um jeweils die maximale Photoreaktivierung zu erreichen. Bei Überlebensraten von 10^{-4} genügen bereits 45 min, um in den Plateaubereich zu kommen, in dem nur noch ein sehr langsamer Anstieg des Überlebensniveaus erfolgt. In den dargestellten Versuchen wurde maximal auf ein Überlebensniveau von 10^{-3} inaktiviert und die Dauer der PhR bei allen Stämmen und UV-Dosen auf 45 min festgelegt.

- Liquid-Holding (LHR):

Bei der LHR Behandlung treten einige methodische Probleme auf. LHR ist jedoch z.Z. die einzige biologische Methode, mit der die Fähigkeit eines Stammes zur Dunkelreparatur (z.B. EXR und/oder REC) untersucht werden kann. Allein die Dauer der Pufferhaltung im Dunkeln verursacht in der unbestrahlten Kontrolle ein Absterben der Zellen z.T. auf ein Drittel des Überlebensniveaus zu Beginn des Versuchs. Das Absterben scheint jedoch nicht kontinuierlich in Abhängigkeit von der LHR-Dauer stattzufinden, sondern unmittelbar nach der UV-Bestrahlung stärker zu sein als nach längerem LHR (Abb. 4). Für die Versuche in dieser Arbeit wurde eine mittlere LHR-Dauer von 5 Tagen gewählt, bei der in den unbestrahlten Kontrollen durchschnittlich 40% der Zellen noch teilungsfähig waren.

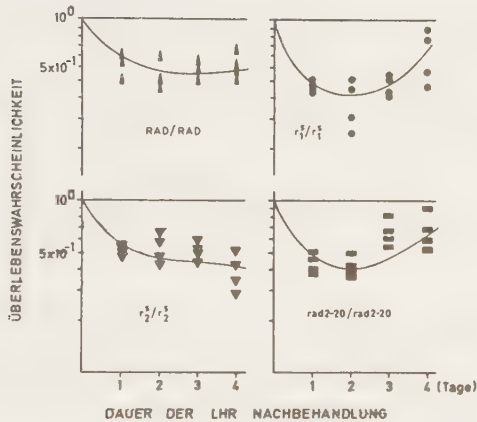


Abb. 4: Die Abhängigkeit der Überlebensraten der unbestrahlten Kontrolle von der Dauer der LHR Behandlung für den RAD, r_1 , r_2 und rad2-20 Diplonten. (Jedes Zeichen stellt einen experimentell ermittelten Wert dar.)

Berechnungen:

- Überlebensrate (U) nach UV-Bestrahlung mit der Dosis x ($= D_x$)

$$U(D_x) = \frac{\text{Aufwuchs nach } D_x}{\text{Aufwuchs ohne Bestrahlung } (D_0)}$$

- Überlebensrate nach UV + Nachbehandlung ($D_x + R$)

$$U(D_x + R) = \frac{\text{Aufwuchs nach } (D_x + R)}{\text{Aufwuchs nach } (D_0 + R)}$$

- Dosisreduktionsfaktor (DRF): Der DRF wird zum Vergleich der Strahlenempfindlichkeit verschiedener Stämme bei gleichem

Überlebensniveau $U(D_x)$ verwendet.

$$DRF_{U(D_x)} = \frac{\text{Dosis für den Wildtyp bei } U(D_x)}{\text{Dosis für den sensiblen Stamm bei } U(D_x)}$$

- Reparaturkapazität (RK) eines sensiblen Stammes im Vergleich zum Wildtyp bei gleichem $U(D_x)$:

$$RK_{U(D_x)} = \frac{\text{Dosis des sensiblen Stammes für } U(D_x)}{\text{Dosis des Wildtyps für } U(D_x)} \cdot 100$$

- Dosismodifikationsfaktor (DMF): Der DMF kennzeichnet die Modifizierung der Wirkung einer UV-Dosis durch eine Nachbehandlung; d.h. welcher "Dosisgewinn" durch die Nachbehandlung bei gleichem Überlebensniveau erzielt wurde.

$$DMF_{U(D_x)} = \frac{\text{Dosis } D_x + R \text{ für } U(D_x) \text{ des Stammes Y}}{\text{Dosis } D_x \text{ für } U(D_x) \text{ des Stammes Y}}$$

- Eine Dosis, mit der eine definierte Inaktivierung erzielt wird, wird als Letaldosis (LD) bezeichnet. LD_1 bedeutet dann jene Dosis, bei der eine Zellpopulation auf 1% Überlebende inaktiviert wird.

Zur Interpretation der Ergebnisse:

Bei der Interpretation von Inaktivierungskurven verschiedener Stämme bieten sich zwei Möglichkeiten:

- Vergleich der Überlebenden bei gleicher Dosis und
- Vergleich der Dosis bei gleicher Überlebensrate.

Werden verschiedene Stämme mit der gleichen UV-Dosis bestrahlt, ist auch die Anzahl der Primärschäden in diesen Stämmen gleich und die unterschiedlichen Wirkungen der UV-Bestrahlung auf die Stämme lassen sich auf diese Zahl beziehen. Bei dieser Darstellung ist jedoch zu beachten, daß die identische Zahl von Primärschäden für unterschiedlich UV-sensible Stämme biologisch unterschiedlich wirksam ist. Deshalb ist es erfor-

derlich, die Auswirkungen von UV-Bestrahlungen nicht nur auf die applizierte Dosis, sondern ebenso auf die Überlebensrate zu beziehen.

In diesem Fall werden Stämme bei gleich wirksamen Mengen von unreparierten Schäden verglichen. Mit diesem Ansatz kann jedoch die unterschiedliche Zahl der Primärschäden bei dem gleichen Überlebensniveau der jeweiligen Stämme nicht berücksichtigt werden. Im Folgenden werden die Auswirkungen der UV-Bestrahlung sowohl auf die Dosis als auch auf die Überlebensraten bezogen.

Besonders bei einer erhöhten Überlebensrate nach PhR und/oder LHR ergibt sich die Frage nach dem Bezugssystem (Dosis bzw. Überlebensrate). Der DMF bezieht sich auf die Zahl der reparierten Primärschäden bei identischen Überlebensraten. Dieser Wert kann aber keine Aussage darüber machen, um wieviel die Überlebensrate nach $D_x + R$ gegenüber der Überlebensrate nach D_x angestiegen ist. Der Reparaturquotient Q_R bezeichnet die Veränderung in den Überlebensraten nach D_x durch eine Nachbehandlung:

$$Q_R = \frac{\bar{U}(D_x + R) \text{ des Stammes Y}}{\bar{U}(D_x) \text{ des Stammes Y}}$$

Somit läßt sich die Reparaturfähigkeit eines Stammes nach einer applizierten UV-Dosis mit anschließender Nachbehandlung charakterisieren, ebenso wie eine mögliche unterschiedliche Gewichtung der Primärschäden bei den einzelnen Stämmen. Mit Q_R ist es ferner möglich, den Einfluß der Nachbehandlungen auf die Überlebensraten mit dem Einfluß der Nachbehandlungen auf die Rekombinationsraten zu vergleichen.

3.1.2. Einfluß von UV auf die Überlebensraten

In Abb. 5 wird die Dosisabhängigkeit der Überlebensraten des RAD, des r_1^S , des r_2^S und des rad2-20 Diplonten dargestellt. Daraus ist ein ähnlicher Kurvenverlauf der RAD, r_1^S und r_2^S Diplonten ersichtlich: ein Schulterbereich geht in einen exponentiellen Abtötungsbereich über. Der Wildtyp RAD Diplont hat die größte Schulter und zeigt im exponentiellen Bereich nur einen relativ schwachen Abfall. Die beiden mittelsensiblen Stämme r_1^S und r_2^S zeigen im Vergleich zum RAD Diplonten eine kleinere, jedoch deutlich ausgeprägte Schulter, die in einen erheblich steiler abfallenden exponentiellen Bereich übergeht. Eine starke Schwänzung, wie sie z.B. bei den zugehörigen Haplonten auftritt (ECKARDT 1974), läßt sich bei diesen Diplonten nicht erkennen. Der rad2-20 Diplont ist der sensibelste dieser Stämme; er weist nur eine minimale Schulterbildung auf. Die Inaktivierungskurve fällt dann bereits bei sehr niedrigen UV-Dosen ($< 40 \text{ erg mm}^{-2}$) sehr steil ab und zeigt bei höheren UV-Dosen ($> 160 \text{ erg mm}^{-2}$) eine Schwanzbildung.

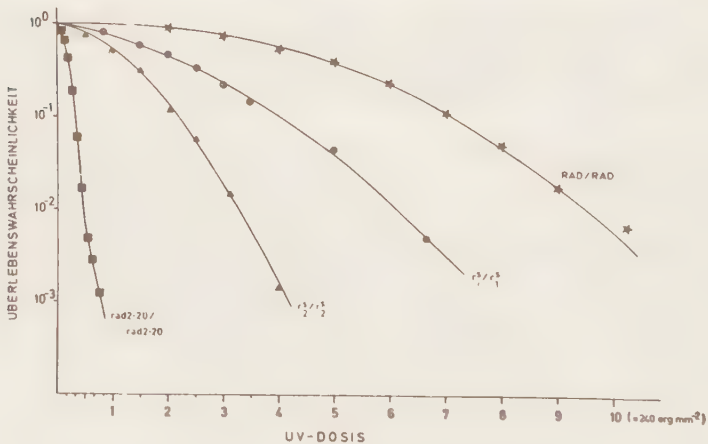


Abb. 5:

Dosisabhängigkeit der Inaktivierung des RAD, r_1^S , r_2^S und rad2-20 Diplonten. (Jeder Punkt stellt einen Mittelwert aus 5-8 unabhängigen Versuchen dar.)

Die DRF Werte der RAD, r_1^S , r_2^S und rad2-20 Diplonten bei LD₁₀ (Tab. 2) stimmen annähernd mit den DRF Werten der original UV-sensiblen Stämme (AVERBECK 1970) überein. Die teilweise verringerte UV-Sensibilität besonders der r_1^S und r_2^S Diplonten ist möglicherweise eine Auswirkung des Abschattungseffekts, da AVERBECK für LD₁₀ ca. 3×10^3 Z/0.1 ml bestrahlte. Für diese Arbeit wurden hingegen Suspensionen mit 10^6 Z/0.1 ml bestrahlt (s. 3.1.1.).

	RAD	r_1^S	r_2^S	rad2-20
DRF	1	1.8	3.3	23.4
DRF n. AVERBECK	1	3.0	4.7	26.4
RK %	100	56.0	30.2	4.3

Tabelle 2:

DRF und RK Werte des RAD, r_1^S , r_2^S und rad2-20 Diplonten bei LD₁₀. Die Werte sind aus den Kurven der Abb. 5 berechnet worden. DRF und RK für den RAD Stamm wurden durch sinngemäße Anwendung der Formel auf S. 32 bestimmt.

An dieser Stelle soll noch kurz auf das "Sensibilitätsgefälle" bei den Diplonten hingewiesen werden. Die UV-Sensibilität der Diplonten nimmt in der Reihenfolge $RAD < r_1^S < r_2^S < rad2-20$ zu. Bei den zugehörigen haploiden Stämmen verläuft diese Zuordnung nicht parallel, da sich die r_1^S und r_2^S Haplonten kaum in ihrer UV-Sensibilität unterscheiden (ECKARDT 1974, AVERBECK 1970, LASKOWSKI und LEHMANN-BRAUNS 1973). Tabelle 3 veranschaulicht dieses Phänomen, auf das in der Diskussion näher eingegangen wird.

	RAD	r_1^S	r_2^S	rad2-20
haploid	1	3.1	2.7	25.6
diploid	1	1.6	2.9	20.6

Tabelle 3:

DRF Werte der RAD, r_1^S , r_2^S und rad2-20 Haplonten und Diplonten bei LD₁.

Der Anteil an atemungsdefekten Zellen nimmt mit steigender Dosis bei allen Stämmen zu. Bei dem r_2^s Diplonten sind nach niedrigen UV-Dosen (720 erg mm^{-2}) alle aufgewachsenen Kolonien atemungsdefekt. Bei den anderen Stämmen steigt der Anteil von 10-20% vor der Bestrahlung auf 50-70% nach der Bestrahlung an. Diese Induktion entspricht den Verhältnissen bei den zugehörigen Haplonten, wie sie bei ECKARDT (1974) ausführlich untersucht und beschrieben wurden.

Vorversuche mit den Diplonten zeigten, daß atemungsdefekte Zellen sich von atemungskompetenten entweder nicht in der UV-Sensibilität unterscheiden, oder gar resistenter sind. Es ist demnach auch denkbar, daß die verringerte UV-Sensibilität der r_1^s und r_2^s Diplonten gegenüber den Originalstämmen nicht nur auf Abschattungseffekte (s.o.), sondern auch auf den hohen Anteil atemungsdefekter Zellen zurückzuführen ist.

3.1.3. Einfluß von UV + PhR auf die Überlebensraten

Abb. 6 ist eine Zusammenstellung der Auswirkung einer 45 min

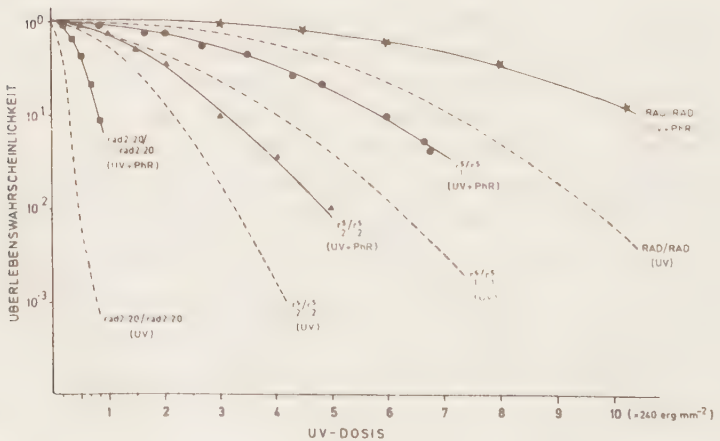


Abb. 6:

Einfluß von UV + PhR auf die Überlebensraten des RAD , und $rad2-20$ Diplonten. Die Werte sind aus 3-5 unabhängigen Versuchen gemittelt.

Überlebens- rate	RAD Diplont	r_1^S Diplont	r_2^S Diplont	rad2-20 Diplont
8.0×10^{-1}	1.89	1.98	1.84	2.18
7.5×10^{-1}	1.77	1.81	1.74	2.19
5.0×10^{-1}	1.44	1.63	1.49	2.30
3.7×10^{-1}	1.52	1.55	1.44	2.38
2.5×10^{-1}	1.48	1.53	1.42	2.42
1.0×10^{-1}	1.50	1.44	1.44	2.55
5.0×10^{-2}	1.53	1.40	1.46	2.55
1.0×10^{-2}	--	--	1.49	--

Tabelle 4:

DMF Werte für die Überlebensraten der RAD, r_1^S , r_2^S und rad2-20 Diplonten nach UV+PhR. Die Werte sind aus den Kurven der Abb. 6 berechnet.

Überlebens- rate	RAD Diplont	r_1^S Diplont	r_2^S Diplont	rad2-20 Diplont
8.0×10^{-1}	1.20	1.16	1.14	1.20
7.5×10^{-1}	1.27	1.20	1.19	1.27
5.0×10^{-1}	1.65	1.46	1.40	1.72
3.7×10^{-1}	1.97	1.69	1.57	2.11
2.5×10^{-1}	2.50	2.08	1.84	2.96
1.0×10^{-1}	4.30	3.20	2.80	6.60
5.0×10^{-2}	6.60	4.20	3.80	11.60
1.0×10^{-2}	16.50	7.50	7.00	44.00
5.0×10^{-3}	25.00	9.60	11.60	72.00

Tabelle 5:

Q_{PhR} Werte für die Überlebensraten der RAD, r_1^S , r_2^S und rad2-20 Diplonten nach UV+PhR. Die Werte sind aus den Kurven der Abb. 6 berechnet.

langen PhR Nachbehandlung auf die Überlebensraten des RAD, r_1^S , r_2^S und rad2-20 Diplonten nach UV-Bestrahlung. Alle Stämme können potentiell letale Schäden in einem erheblichen Maß reparieren. In den Tabellen 4 und 5 sind die aus Abb. 6 berechneten DMF bzw. Q_{PhR} Werte für verschiedenen Überlebensarten aufgeführt.

Tab. 5 gibt an, in welchem Maße präletale Primärschäden durch PhR repariert werden. Die Erhöhung der Überlebensraten nach PhR ist von der inaktivierenden UV-Dosis, aber auch von der Überlebensrate unmittelbar nach der UV-Bestrahlung abhängig, nämlich von einem bestimmten physiologischen Zustand der bestrahlten Zellen. Die anscheinend größere PhR-Kapazität des rad2-20 Diplonten (Tab. 5) könnte durch Folgendes erklärt werden:

- ein besser funktionierendes PhR-System
- die fehlende Konkurrenz von Enzymen eines Dunkelreparatursystems (z.B. des EXR).

Die erste Möglichkeit ist nicht im Rahmen dieser Arbeit mit ausführlichen Kinetiken untersucht worden. Sie erscheint aber nicht sinnvoll.

Es ist bekannt, daß Stämme sofort nach -- oder sogar während -- der UV-Bestrahlung mit Dunkelreparaturprozessen beginnen. Bei Stämmen mit einem intakten EXR System konkurrieren daher EXR-Enzyme und PhR-Enzyme um dasselbe Substrat. Die rad2-20 Mutation betrifft jedoch das EXR System (UNRAU et al. 1971, RESNICK und SETLOW 1972), vermutlich sogar in einem frühen Schritt. Dadurch bleibt bei diesem Stamm die Konkurrenz des EXR Systems für die UV-induzierten Schäden aus. Theoretisch ist es möglich, daß das PhR-Enzym alle UV-induzierten Pyrimidindimere des rad2-20 während der PhR Behandlung repariert.

Nach der PhR Behandlung sinkt der Anteil der UV-induzierten atmungsdefekten Kolonien ab.

Aus Abb. 6, sowie den Tab. 4 und 5 geht hervor, daß kein Stamm eine 100%ige photoenzymatische Reparaturfähigkeit zeigt. Selbst bei dem rad2-20 Diplonten verbleibt nach PhR noch ein

Rest nicht reparierter UV-Schäden. Entweder stellen photoreaktivierbare $\hat{P}P$ nur einen Teil der UV-induzierten Letalschäden dar (ca. 50-70%), oder es tritt tatsächlich eine kompetitive Hemmung durch Enzyme eines Dunkelreparatursystems auf. Letzteres trifft möglicherweise sogar für den *rad2-20* Diplonten zu. Wenn dieser Stamm defekte Endonukleasemoleküle besitzt, die sich an die $\hat{P}P$ binden aber nicht einschneiden können, wird den PhR-Enzym-Molekülen Substrat entzogen. Die derart "maskierten" $\hat{P}P$ bleiben als Letalschäden erhalten und können nicht durch PhR repariert werden.

3.1.4. Einfluß von UV + LHR auf die Überlebensraten

In Abb. 7 ist der Einfluß einer 5-tägigen LHR Nachbehandlung auf die Überlebensraten des *RAD*, r_1^S , r_2^S und *rad2-20* Diplonten dargestellt. Entsprechend den Werten bei PhR sind aus diesen Kurven die DMF und Q_{LHR} Werte berechnet und in den Tabellen 6 und 7 aufgeführt worden.

Ein Vergleich der Abb. 6 und 7 zeigt, daß alle Stämme nach

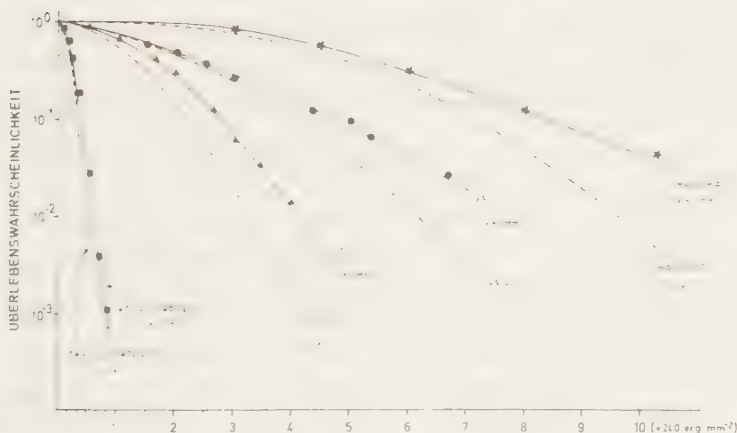


Abb. 7: Einfluß von UV + LHR auf die Überlebensraten des *RAD*, r_1^S , r_2^S und *rad2-20* Diplonten. Jeder Punkt ist ein Mittelwert aus 3-5 unabhängigen Versuchen.

Überlebens- rate	RAD Diplont	r_1^s Diplont	r_2^s Diplont	rad2-20 Diplont
8.0×10^{-1}	1.21	1.17	1.60	1.39
7.5×10^{-1}	1.14	1.14	1.55	1.37
5.0×10^{-1}	1.13	1.10	1.35	1.27
3.7×10^{-1}	1.14	1.09	1.30	1.26
2.5×10^{-1}	1.15	1.15	1.27	1.26
1.0×10^{-1}	1.19	1.20	1.28	1.29
5.0×10^{-2}	1.22	1.24	1.28	1.29
1.0×10^{-2}	--	1.26	1.27	1.25
5.0×10^{-3}	--	--	1.28	1.25

Tabelle 6:

DMF Werte für die Überlebensraten der RAD, r_1^s , r_2^s und rad2-20 Diplonten nach UV+LHR. Die Werte sind aus den Kurven in Abb. 7 berechnet.

Überlebens- rate	RAD Diplont	r_1^s Diplont	r_2^s Diplont	rad2-20 Diplont
8.0×10^{-1}	1.08	1.03	1.11	1.10
7.5×10^{-1}	1.09	1.04	1.13	1.13
5.0×10^{-1}	1.16	1.10	1.30	1.30
3.7×10^{-1}	1.27	1.14	1.43	1.49
2.5×10^{-1}	1.44	1.26	1.60	1.68
1.0×10^{-1}	2.10	1.70	2.25	2.60
5.0×10^{-2}	2.78	2.20	2.70	3.60
1.0×10^{-2}	5.70	4.10	4.70	5.40
5.0×10^{-3}	6.80	5.40	6.20	4.60

Tabelle 7:

Q_{LHR} Werte für die Überlebensraten der RAD, r_1^s , r_2^s und rad2-20 Diplonten nach UV+LHR. Die Werte sind aus den Kurven in Abb. 7 berechnet.

LHR weniger zur Dunkelreparatur (z.B. EXR und/oder REC) fähig sind als zur Photoreaktivierung. Dieses Phänomen ist erstaunlich, da für den Wildtyp RAD Diplonten das größte Ausmaß an LHR-Vermögen zu erwarten wäre. Der rad2-20 Diplont hingegen, dürfte nur eine geringe Fähigkeit zur Dunkelreparatur besitzen, da er im EXR System defekt ist.

Mit der LHR-Methode sind einige Interpretationsschwierigkeiten verbunden (s. 3.1.1.); so z.B. die hohe Absterberate in den unbestrahlten Kontrollen und die Behandlungsdauer. Weiterhin ist die Frage zu berücksichtigen, ob die Suspension während des Liquid-Holding gut belüftet und geschüttelt werden soll, oder ob sie nur im Dunkeln stehen soll.

- Die Absterberate in den Kontrollen war in allen 4 Stämmen hoch, jedoch schwankten auch diese Kontrollwerte in Abhängigkeit von der LHR-Dauer (Abb. 4). Allein die hohe Inaktivierung der unbestrahlten Kontrollen vermag nicht die geringe LHR-Fähigkeit der 4 Diplonten zu erklären. Ein starkes Absterben in den unbestrahlten Kontrollen könnte eher ein größeres Dunkelreparaturvermögen vortäuschen, da $\bar{U}(D_x + \text{LHR})$ immer auf $\bar{U}(D_0 + \text{LHR})$ bezogen wird, und nicht auf $\bar{U}(D_0)$.
- Die Dauer der LHR-Behandlung scheint die Dunkelreparatur zu beeinflussen. In Abb. 8 sind LHR Kinetiken für einige bestrahlte und unbestrahlte Suspensionen dargestellt. Ähnliche Kinetiken wie die der Abb. 8 erhielt ECKARDT auch für die zugehörigen haploiden Stämme (ECKARDT, unveröffentlicht). Inwieweit ausschließlich die Dauer der LHR-Behandlung für die geringe Auswirkung des Liquid-Holding auf die Dunkelreparatur der Stämme verantwortlich ist, läßt sich nicht ohne weiteres feststellen. Da zusätzlich stammspezifische Unterschiede auftreten, bedarf es noch vieler Untersuchungen, um eine eindeutige Interpretation von LHR-Versuchen zu erhalten.
- Eine weitere Möglichkeit, das geringe Ausmaß an LHR zu erklären, liegt in der Methode des Liquid-Holding: ob die

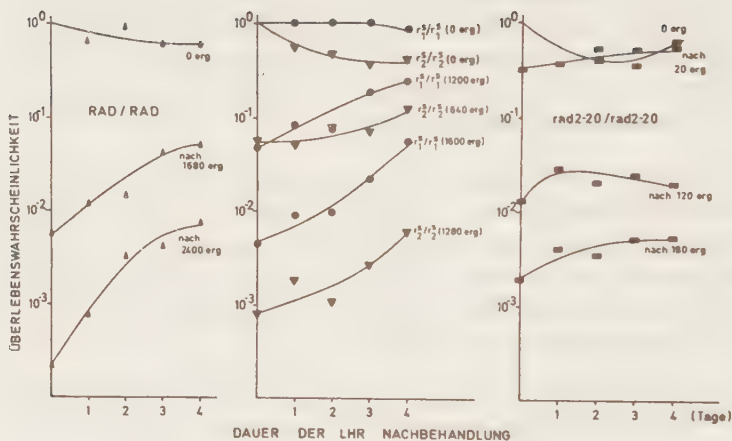


Abb. 8:

LHR-Kinetik für die unbestrahlte und einige bestrahlte Suspensionen des RAD, r_1 , r_2 und rad2-20 Diplonten. Jeder Punkt entspricht einem experimentell ermittelten Wert.

Suspensionen bei guter Belüftung geschüttelt werden, oder nur im Puffer stehen. (Der Einfluß von Glukosezusätzen während des Liquid-Holding soll an dieser Stelle nicht weiter ausgeführt werden. Er wurde von SCHAARSCHMIDT (1972) genauer untersucht und beschrieben.) Langes Schütteln in einem warmen, trockenen Raum bewirkt eine Verdunstung des Puffers, wodurch die Zelldichte erhöht und eine Zunahme an Überlebenden vorgetäuscht werden kann. Mit einer Schüttel-einrichtung in einer dunklen, feuchten und warmen Kammer läßt sich solche Verdunstung vermeiden. In Ermangelung einer derartigen Kammer wurde auch auf das Schütteln der Suspensionen während des Liquid-Holding verzichtet, um eine möglichst konstante Zelldichte zu gewährleisten. In unbewegten Suspensionen setzen sich die Zellen jedoch am Boden des Gefäßes ab. Dort tritt Sauerstoffmangel auf und

dadurch möglicherweise eine Umstellung des Stoffwechsels, die wahrscheinlich stammspezifisch ist. Der Einfluß abge-
schiedener Stoffwechselprodukte könnte größer sein, wenn
die Zellen dicht übereinander geschichtet sind, als wenn
sie gleichmäßig in der Suspension verteilt sind. Die Aus-
wirkung dieser Faktoren auf die Dunkelreparatur während
des Liquid-Holding ist noch nicht bekannt. Sogar in gut
belüfteten und geschüttelten Suspensionen starben die Kon-
trollen bereits nach 3 Tagen auf 30-40% Überlebende ab
(ECKARDT, unveröffentlicht).

Auffallend ist die erhebliche Zunahme der atmungsdefekten
Kolonien nach LHR. Bei den unbestrahlten Kontrollen sind nach
LHR mindestens 50%, bei den bestrahlten Suspensionen sogar 70-
80% der Überlebenden atmungsdefekte Kolonien. Ob diese erhöhte
Atmungsdefizienz durch die fehlende Belüftung verursacht wird,
mag dahingestellt sein. Ein Einfluß der atmungsdefekten Zellen
auf die Fähigkeit der gesamten Zellpopulation zur Dunkelrepara-
tur ist denkbar; Art und Ausmaß des Einflusses sind jedoch nicht
bekannt. Auch ist noch nicht geklärt, ob die atmungsdefekten
Zellen durch eine Reparatur UV-induzierter Schäden während des
Liquid-Holding entstehen, oder ob atmungskompetente Zellen wäh-
rend LHR selektiv absterben.

3.1.5. Einfluß von UV + PhR + LHR auf die Überlebensraten

Abb. 9 gibt den Einfluß einer kombinierten Nachbehandlung
(45 min PhR + 5 Tage LHR) auf die Überlebensraten des RAD, r_1^S ,
 r_2^S und rad2-20 Diplonten wieder. Auch für diese Nachbehandlun-
gen sind die entsprechenden DMF und $Q_{\text{PhR+LHR}}$ Werte berechnet
worden. Diese Werte sind in den Tabellen 8 und 9 aufgeführt.

Ein Vergleich der Abb. 6, 7 und 9 zeigt, daß die Erhöhung
der Überlebensraten nach einer kombinierten Nachbehandlung beim
RAD, r_1^S und rad2-20 Diplonten beachtlich größer ist als durch
die jeweiligen Einzelbehandlungen. Der r_2^S Diplont hat zwar eine
geringe Zunahme an Überlebenden nach PhR+LHR, aber diese ist
erheblich geringer, als die Erhöhung nach PhR bzw. LHR.

Überlebens- rate	RAD Diplont	r_1^s Diplont	r_2^s Diplont	rad2-20 Diplont
8.0×10^{-1}	2.63	1.56	1.20	3.92
7.5×10^{-1}	2.50	1.56	1.22	3.67
5.0×10^{-1}	2.23	1.49	1.17	3.24
3.7×10^{-1}	2.19	1.47	1.14	3.28
2.5×10^{-1}	--	1.53	1.12	3.31
1.0×10^{-1}	--	1.56	1.13	3.35
5.0×10^{-2}	--	1.66	1.13	--
1.0×10^{-2}	--	--	1.12	--
5.0×10^{-3}	--	--	1.12	--

Tabelle 8:

DMF Werte für die Überlebensraten der RAD, r_1^s , r_2^s und rad2-20 Diplonten nach UV+PhR+LHR. Die Werte sind aus den Kurven in Abb. 9 berechnet.

Überlebens- rate	RAD Diplont	r_1^s Diplont	r_2^s Diplont	rad2-20 Diplont
8.0×10^{-1}	1.25	1.11	1.06	1.25
7.5×10^{-1}	1.32	1.13	1.07	1.34
5.0×10^{-1}	1.84	1.34	1.14	1.96
3.7×10^{-1}	2.35	1.54	1.22	2.57
2.5×10^{-1}	3.32	1.88	1.28	3.70
1.0×10^{-1}	7.40	2.95	1.60	8.60
5.0×10^{-2}	13.20	4.44	1.66	41.00
1.0×10^{-2}	50.00	11.00	2.30	68.00
5.0×10^{-3}	90.00	15.20	2.60	120.00

Tabelle 9:

$Q_{PhR+LHR}$ Werte für die Überlebensraten der RAD, r_1^s , r_2^s und rad2-20 Diplonten nach UV+PhR+LHR. Die Werte sind aus den Kurven in Abb. 9 berechnet.

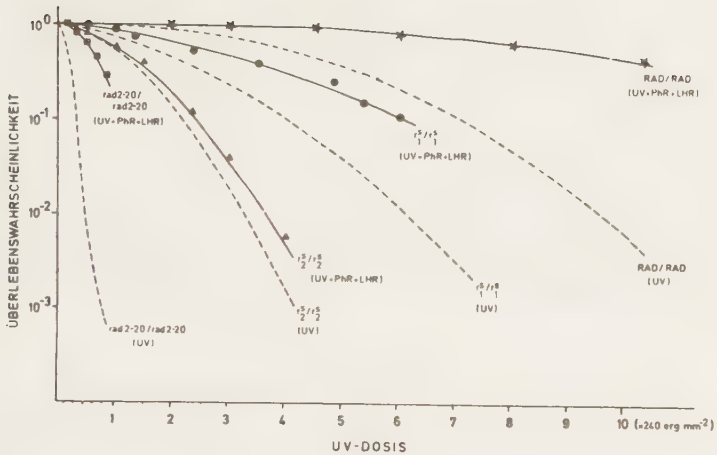


Abb. 9:

Auswirkung der kombinierten Nachbehandlung (PhR+LHR) auf die Überlebensraten des RAD, r_1^s , r_2^s und rad2-20 Diplonten. Jeder Punkt ist ein Mittelwert aus 3 unabhängigen Versuchen.

Aus einer vergleichenden Zusammenfassung der mittleren DMF Werte verschiedener Nachbehandlungen (Tabelle 10), ist ein fast

Stamm	DMF _{PhR}	DMF _{LHR}	DMF _{P+L^x}	berechnete Additivität
RAD	1.49	1.17	2.37	2.66
r_1^s	1.52	1.16	1.55	2.68
r_2^s	1.44	1.35	1.15	2.79
rad2-20	2.44	1.29	3.46	3.73

Tab. 10:

Die mittleren DMF Werte für PhR, LHR und PhR+LHR des RAD, r_1^s , r_2^s und rad2-20 Diplonten. Die errechneten additiven Werte sind als Vergleich hinzugefügt. ($P+L^x = \text{PhR}+\text{LHR}$)

additives Verhalten der PhR und LHR Behandlungen bei dem RAD und dem rad2-20 Diplonten zu erkennen. Die Doppelbehandlung bewirkt bei dem r_1^s Diplonten kaum eine Erhöhung der Überlebensraten gegenüber denen nach einer PhR Behandlung. Bei dem r_2^s Diplonten hingegen, scheint die Doppelbehandlung sich negativ auf die Reparatur auszuwirken. Es ist zu beachten, daß die Mittelwerte in Tab. 10 nur Anhaltswerte sein können. Ihre Berechnung im Bereich von 50 bis 5% Überlebende erscheint jedoch berechtigt, da die DMF_{PhR} Werte zwischen 50 und 5%, die DMF_{LHR} und die $DMF_{PhR+LHR}$ Werte sogar zwischen 80 und 5% Überlebende von der Überlebensrate annähernd unabhängig sind (vgl. Tab. 4, 6 und 8).

Aus Abb. 9 und Tab. 9 ist ferner ersichtlich, daß der RAD und der rad2-20 Diplont nach einer kombinierten Behandlung bei geringen Abtötungen (auf 80% Ü für den RAD und auf 75% Ü für den rad2-20 Diplonten) eine vollständige Reparatur zeigen: die Überlebensraten erreichen wieder 10^0 ($\equiv 100\%$). Bei den anderen Stämmen, sowie bei diesen beiden Stämmen nach höheren Inaktivierungen, können anscheinend nicht mehr alle potentiellen Letalschäden repariert werden. Ob dies an der Art der UV-Schäden liegt, oder an der Art und Dauer der Nachbehandlungen, läßt sich aufgrund der vorhandenen Ergebnisse nicht feststellen.

Nach PhR+LHR ist der Anteil atmungsdefekter Kolonien genauso groß wie nach einer LHR Behandlung. Die Auswirkung von Liquid-Holding auf die Atmungsfähigkeit scheint somit stärker (oder anhaltender ?) zu sein als die Wirkung von PhR.

3.2. Einfluß von UV, PhR, LHR und PhR+LHR auf die Rekombinationsraten.

3.2.1. Methodisches

Mitotische intergenische Rekombinationsereignisse sind durch das Auftreten von auxotrophen Sektoren und Kolonien in einer für Histidin prototrophen Zellpopulation erkennbar. Umgekehrt entstehen adenin-prototrophe Kolonien und Sektoren in einer für Adenin auxotrophen Zellpopulation durch intragenische Rekombination (s. Tab. 1, Anhang I und KOWALSKI 1971).

Da auxotrophe Zellen auf einem entsprechenden Mangelmedium nicht wachsen, sondern nur die prototrophen intragenischen Rekombinanten, können große Zellpopulationen leicht und schnell auf intragenische Rekombinationsereignisse untersucht werden. Diese Ereignisse treten mit einer spontanen Häufigkeit von 10^{-5} bis 10^{-4} auf; so lassen sich Populationen von 10^7 Zellen bequem überprüfen. Da diese Methode lediglich die Fähigkeit zur Adeninsynthese als Selektionsmerkmal benutzt, und daher von der Koloniefärbung unabhängig ist, erscheint sie besonders vorteilhaft (s. 2.1.1.).

Bei dieser Methode weisen aufgewachsene prototrophe Zellen auf ein molekularbiologisches Geschehen hin (z.B. Rekombination), obwohl ein prototropher Phänotyp auch durch Rückmutation oder Suppressormutation entstehen kann. Die spontane Mutationshäufigkeit liegt einige Dekaden unter der intragenischen Rekombinationshäufigkeit (zwischen 10^{-8} und 10^{-7}); dennoch können einige der "Rekombinanten" eigentliche Rückmutanten sein.

Mögliche Fehlerquellen der selektiven Methode sind von HAEFNER (1961 und 1965), sowie von AUERBACH und RAMSAY (1971) für die Mutationsraten genau untersucht worden. Ein signifikanter Einfluß der ausplattierten Zelldichte oder auch der eventuell vorhandenen Restteilung auf die Mutationshäufigkeiten wurde von diesen Autoren nicht festgestellt. ECKARDT (1974) konnte auch zwischen prototrophen und auxotrophen Zellen vor und nach UV-Bestrahlung keine signifikanten Unterschiede in der

UV-Sensibilität feststellen. Dies ist ein Hinweis dafür, daß prototrophe Zellen in Bestrahlungsversuchen keinen selektiven Vorteil haben. Obwohl alle diese Untersuchungen in Bezug auf die UV-induzierten Mutationsraten durchgeführt wurden, müßten sie genauso für die intragenischen Rekombinationsraten gelten, da das Selektionsverfahren das gleiche ist.

Für die Ermittlung der intergenischen Rekombinationsereignisse kann ein selektives Verfahren nicht angewendet werden. Die auxotrophen Rekombinanten können erst dann erfaßt werden, wenn alle Kolonien nach einer UV-Bestrahlung zunächst auf einem kompletten Medium wie VM anwachsen. Nach Überstempeln auf ein entsprechendes Mangelmedium lassen sich die Rekombinanten dann durch fehlendes Wachstum auf dem Mangelmedium erkennen. Diese Methode hat den Nachteil, daß pro Platte nur 100-200 Kolonien überprüft werden können (gegenüber 10^6 bis 10^7 Zellen pro Platte im selektiven Verfahren), da jede Platte noch überstempelt und der gesamte Aufwuchs der Mangelmedien mit dem auf der Originalplatte verglichen werden muß.

Berechnungen:

Die Bestimmung der Überlebensraten, wie sie in 3.1.1. dargestellt ist, bildet auch die Grundlage für die Berechnung der UV-induzierten Rekombinationsraten (Rfr).

Von der Versuchsanordnung ausgehend (Abb. 2 und 2.6.2.) werden die intergenischen Rfr stets als prozentualer Anteil von Rekombinationsereignissen (RE) im Aufwuchs nach D_x bestimmt. Die Inaktivierung braucht nicht mehr einbezogen zu werden, da sie bereits in der ausplattierten Zellmenge berücksichtigt wurde.

- intergenische Rekombinationsraten

$$\text{interg. Rfr}(D_x) = \frac{\text{RE}(D_x)}{\text{Aufwuchs nach } D_x} - \frac{\text{RE}(D_0)}{\text{Aufwuchs nach } D_0}$$

Die intragenischen Rekombinationsraten, die im selektiven Verfahren ermittelt werden, müssen hingegen wie folgt berechnet werden:

$$\text{intrag. Rfr}(D_x) = \frac{RE(D_x) - RE(D_0) \cdot U(D_x)}{\text{Aufwuchs auf MM bzw. VM nach } D_x}$$

Der Q_R Wert (Berechnung entsprechend 3.1.1.) beschreibt die Auswirkung der Nachbehandlungen (PhR, LHR und PhR+LHR) auf die Rfr.

Somit kann der Einfluß der Nachbehandlungen auf die Rfr mit dem auf die Überlebenden verglichen werden.

$$Q_{R \text{ inter}} \text{ (bzw. } Q_{R \text{ intra}}) = \frac{\text{Rfr}(D_x + R) \text{ für Stamm Y}}{\text{Rfr}(D_x) \text{ für Stamm Y}}$$

$Q_{R \text{ inter}}$ bezieht sich auf die interg. Rfr

$Q_{R \text{ intra}}$ bezieht sich auf die intrag. Rfr

Anhand der berechneten Rekombinantenzahlen (RZ) kann die Induktion von RE festgestellt werden. Bei der Berechnung der RZ wird die Inaktivierung nach D_x nicht berücksichtigt, und die Zahl der Rekombinationsereignisse bei jeder Dosis auf eine einheitliche Zellpopulation von 10^4 Zellen bezogen.

- intragenische RZ:

$$RZ_{\text{intrag.}} = \frac{RE(D_x) - RE(D_0)}{\text{Aufwuchs auf MM bzw. VM bei } D_0}$$

- intergenische RZ: In diesem Fall müssen sämtliche Verdünnungen mit berücksichtigt werden.

$$RZ_{\text{interg.}} = \frac{RE(D_x)}{\text{Aufwuchs auf VM bei } D_0 \cdot VF \cdot (K(D_x)/K(D_0))} - \frac{RE(D_0)}{K(D_0)}$$

VF ist der Faktor, um den bei D_x mehr Zellen ausplattiert wurden als bei D_0 ; K bedeutet "Kolonienzahl", Aufwuchs.

($K(D_x)/K(D_0)$) ist als Korrekturfaktor nötig, um unterschiedlich große Zellpopulationen verschiedener Bestrahlungen miteinander vergleichen zu können.

Zur Interpretation der Ergebnisse:

Für die Berechnung der interg. Rfr wurden nur ganze Kolonien, halbe oder viertel Sektoren mit einem für Histidin auxotrophen Phänotyp als mitotisch-intergenische Rekombinanten gewertet (s. 2.6.1.). Da der reziproke Genotyp einer solchen Rekombinante sich phänotypisch nicht von dem Ausgangsphänotyp der Kultur unterscheidet, ist er mit dieser Methode nicht erfassbar. Somit stellt die angegebene Zahl der Rekombinanten nur einen Teil der theoretisch möglichen dar. (Eine schematische mitotische Segregation ist zur Darstellung der theoretischen Aufspaltungsmöglichkeiten in Anhang I aufgeführt.)

Bei der Ermittlung von intergenischen Rekombinanten durch Überstempeln der VM Platten auf Mangelmedien, haben auxotrophe und prototrophe Zellen zunächst die gleiche Aufwuchschance nach UV-Bestrahlung. Restwachstum, sowie durch Atmungsdefizienz bedingtes schwaches Wachstum auf dem Mangelmedium erschwerten teilweise die Auswertung. Kolonien oder Sektoren, die weder auf MM-His noch auf MM wuchsen, wurden nicht als Rekombinanten gewertet, da das mangelnde Wachstum auf MM-His nicht eindeutig auf eine Histidinbedürftigkeit (und damit auf ein Rekombinationsereignis) zurückzuführen war.

Die intrag. Rekombinanten wachsen im Gegensatz zu Mutanten schnell auf. Bereits nach 3-5 Tagen gibt es kein weiteres Restwachstum mehr. Für die Absicherung der UV-induzierten intrag. Rfr wurden Parallelversuche zur Ermittlung der UV-induzierten Mutationsraten mit homozygoten Diplonten (Tab. 1) durchgeführt (s. 3.4). Zusätzlich wurden in den Rekombinationsversuchen die MM-Ade Platten mit prototrophen Kolonien auf MM-Lys gestempelt. Entstehen prototrophe Kolonien durch eine Suppressormutation, dann haben sie nicht nur den ADE, sondern auch den LYS Phänotyp (s. 2.1.1.). Somit konnten eventuell auftretende Suppressormu-

tationen identifiziert und von der Zahl der intrag. RE (der für Adenin prototrophen Kolonien) abgezogen werden.

Die hier ermittelten intrag. Rfr stellen nur einen Teil der insgesamt möglichen Rekombinationshäufigkeiten dar (s. Anhang I).

Die in 3.1.1. angeführten Überlegungen zur Interpretation von Inaktivierungskurven in Bestrahlungsversuchen mit und ohne Nachbehandlung (-en) treffen ebenso für die Kurven zu, die aus den Rekombinationsversuchen hervorgehen.

3.2.2. Einfluß von UV auf die Rekombinationsraten

3.2.2.1. Nachweis der Induktion von Rekombinationsereignissen

Zunächst muß gezeigt werden, daß Rekombinanten durch UV-Bestrahlung induziert und nicht selektiert werden. Hierzu wird die Zahl der Rekombinanten nach einer UV-Bestrahlung ohne Berücksichtigung der Inaktivierung einer Zellpopulation bei D_x berechnet. Der Nachweis einer Induktion ist dann erbracht, wenn nach der Bestrahlung mehr Rekombinanten vorhanden sind als in der unbestrahlten Kontrolle.

In Abb. 10 sind die Rekombinantenzahlen (RZ) pro 10^4 Zellen in Abhängigkeit von der UV-Dosis dargestellt. Bei dem r_2^s Diplonten konnten in 9 unabhängigen Versuchen keine inter- oder intragenischen Rekombinanten festgestellt werden. Die anderen Diplonten zeigten sowohl für die inter- als auch für die intragenischen RZ dosisabhängige Maxima, wenn auch in unterschied-

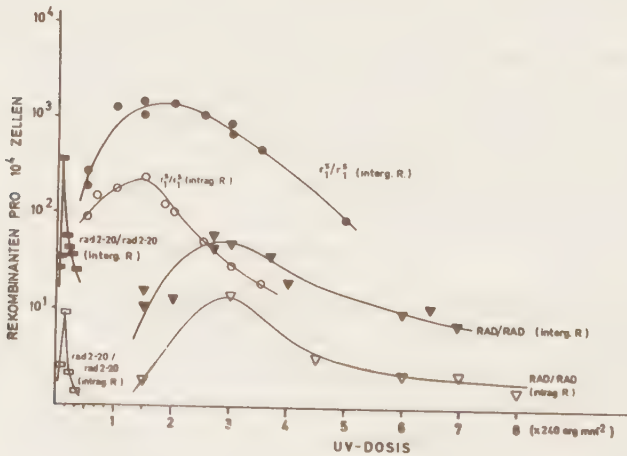


Abb. 10:

Dosisabhängigkeit der Rekombinantenzahlen des RAD, r_1^s und rad2-20 Diplonten. Jeder Punkt bezeichnet einen experimentell ermittelten Wert.

lichen Dosisbereichen. Auffallend ist die hohe Zahl inter- und intragenischer Rekombinanten bei dem r_1^S Diplonten. Nach einer Dosis von 360 erg mm^{-2} sind es 27-mal mehr intergenische Rekombinanten als bei dem RAD Diplonten (1.5×10^3 gegenüber 55); nach derselben Dosis liegt die Zahl der intragenischen Rekombinanten des r_1^S Diplonten um das 130-fache höher als bei dem RAD Stamm, d.h. 250 gegenüber 1.8.

Der rad2-20 Diplont induziert ebenfalls mehr intergenische Rekombinanten als der Wildtyp RAD Diplont, wenn auch in einem wesentlich niedrigeren Dosisbereich als der r_1^S Diplont. Der jeweils höchste Induktionswert beträgt für den rad2-20 Diplonten 360 intergenische RE gegenüber 60 für den RAD Diplonten.

Eine Induktion der inter- und intragenischen RE findet in folgenden Dosisbereichen statt:

- bei dem rad2-20 Diplonten, 4 bis 80 erg mm^{-2}
- bei dem r_1^S Diplonten, 120 bis 1200 erg mm^{-2}
- bei dem RAD Diplonten, 340 bis 1680 erg mm^{-2}

Diese Tatsache deutet darauf hin, daß die Induktion von Rekombinationseignissen nicht allein von der applizierten UV-Dosis abhängt, da bei einer unmittelbaren Dosisabhängigkeit die drei Stämme eine Induktion in demselben Dosisbereich aufweisen müßten. Möglicherweise liegt hier zusätzlich eine Abhängigkeit von der Reparaturfähigkeit der Stämme vor. Ferner findet bei den r_1^S und rad2-20 Diplonten die maximale Induktion von intragenischen Rekombinanten nicht im identischen Dosisbereich statt wie die der intergenischen RE. Bei dem RAD Diplonten liegen die beiden Induktionsmaxima jedoch in demselben Dosisbereich.

Ein Vergleich der RZ in den unbestrahlten Kontrollen mit den jeweiligen RZ bei der größten Induktion läßt sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Bei dem RAD Stamm wird die intergenische RZ durch Induktion verdoppelt, während die intragenische RZ um das 8-fache über den Kontrollwerten liegt.

- Bei dem r_1^S Diplonten werden die intergenischen RE um das 6-fache gegenüber den Werten in den unbestrahlten Kontrollen erhöht, bei den intragenischen jedoch um das 30-fache.
- Der rad2-20 Diplont zeigt für die intergenischen RE eine Induktion um das 14-fache gegenüber den Werten in den unbestrahlten Kontrollen. Die intragenischen RE nehmen um das 4-fache zu.

3.2.2.2. UV-induzierte Rekombinationsraten

In Tabelle 11 sind die inter- und intragenischen mitotischen Rekombinationsraten (Rfr) aller Diplonten für verschiedene Überlebensniveaus aufgeführt. Bei dem r_2^S Diplonten konnten keine Rekombinanten festgestellt werden (s. auch 3.2.2.1.). Aus Tab. 11 geht hervor, daß eine Rfr für den r_2^S Diplonten, falls vorhanden, im Bereich der Mutationsraten liegen muß.

Abb. 11 zeigt die Dosisabhängigkeit der UV-induzierten Rfr.

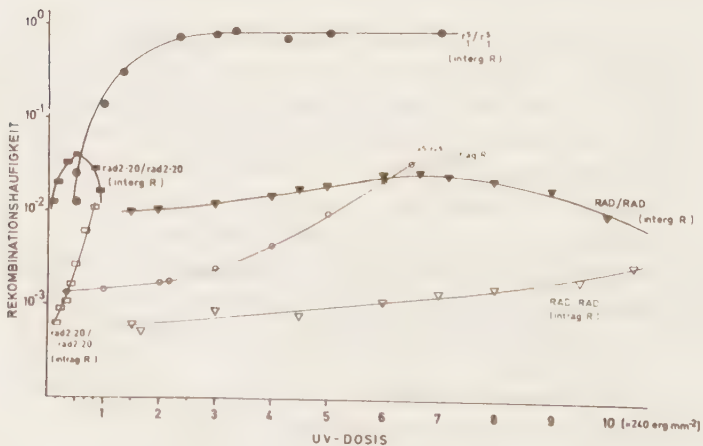


Abb. 11: Dosisabhängigkeit der UV-induzierten inter- und intragenischen Rekombinationsraten des RAD, r_1^S und rad2-20 Diplonten. Jeder Punkt stellt einen Mittelwert aus 2-8 unabhängigen Versuchen dar.

	Überlebens- rate	RAD Diplont	r_1^s Diplont	r_2^s Diplont	rad2-20 Diplont
Intergenische Rekombinationsraten	9.0×10^{-1}	1.0×10^{-2}	6.7×10^{-2}	$0 / 10^4$	1.1×10^{-2}
	8.0×10^{-1}	1.12×10^{-2}	2.4×10^{-1}	$0 / 10^4$	1.2×10^{-2}
	7.5×10^{-1}	1.18×10^{-2}	3.3×10^{-1}	$0 / 10^4$	1.5×10^{-2}
	5.0×10^{-1}	1.6×10^{-2}	7.1×10^{-1}	$0 / 10^4$	2.1×10^{-2}
	3.7×10^{-1}	2.0×10^{-2}	8.4×10^{-1}	$0 / 10^4$	2.4×10^{-2}
	2.5×10^{-1}	2.15×10^{-2}	9.0×10^{-1}	$0 / 10^4$	2.7×10^{-2}
	1.0×10^{-1}	2.55×10^{-2}	9.0×10^{-1}	$0 / 10^4$	3.2×10^{-2}
	5.0×10^{-2}	2.3×10^{-2}	9.2×10^{-1}	$0 / 10^4$	3.4×10^{-2}
	1.0×10^{-2}	1.35×10^{-2}	9.4×10^{-1}	$0 / 10^4$	3.9×10^{-2}
	5.0×10^{-3}	9.8×10^{-3}	---	$0 / 10^4$	3.9×10^{-2}
Intragenische Rekombinationsraten	1.0×10^{-3}	---	---	$0 / 10^4$	2.2×10^{-2}
	9.0×10^{-1}	---	1.35×10^{-3}	$0 / 10^7$	---
	8.0×10^{-1}	6.7×10^{-4}	1.35×10^{-3}	$0 / 10^7$	---
	7.5×10^{-1}	7.0×10^{-4}	1.43×10^{-3}	$0 / 10^7$	---
	5.0×10^{-1}	8.4×10^{-4}	1.65×10^{-3}	$0 / 10^7$	6.7×10^{-4}
	3.7×10^{-1}	9.2×10^{-4}	1.95×10^{-3}	$0 / 10^7$	7.5×10^{-4}
	2.5×10^{-1}	1.1×10^{-3}	2.4×10^{-3}	$0 / 10^7$	8.5×10^{-4}
	1.0×10^{-1}	1.3×10^{-3}	4.6×10^{-3}	$0 / 10^6$	1.1×10^{-3}
	5.0×10^{-2}	1.6×10^{-3}	8.2×10^{-3}	$0 / 10^6$	1.2×10^{-3}
	1.0×10^{-2}	2.4×10^{-3}	2.8×10^{-2}	$0 / 10^6$	2.1×10^{-3}
	5.0×10^{-3}	2.8×10^{-3}	4.3×10^{-2}	$0 / 10^5$	2.9×10^{-3}
	1.0×10^{-3}	---	---	$0 / 10^5$	7.7×10^{-3}

Tab. 11:

Zusammenfassung der Rekombinationsraten des RAD, r_1^s , r_2^s und rad2-20 Diplonten für verschiedene Überlebensraten. Die Angaben für den r_2^s Diplonten beziehen sich auch auf Populationen überlebender Zellen. Die Raten sind Mittelwerte aus 2-8 unabhängigen Versuchen.

Im Gegensatz zur Induktion der Rekombinanten, zeigen nur die intergenischen Rfr des RAD und des rad2-20 Diplonten Maxima. Die intergenischen Rfr des r_1^s Diplonten hingegen, erreichen ein Plateau. Für die intragenischen Rfr zeigen alle drei Diplonten hyperbolisch ansteigende Kurven.

Die Kurven der UV-induzierten inter- und intragenischen Rfr weisen folgende Charakteristika auf:

-für den RAD Diplonten:

- Die i n t e r g. Rfr steigen zwischen 360 und 1600 erg mm^{-2} von 10^{-2} auf 2.7×10^{-2} an und fallen dann wieder ab.
- Die i n t r a g. Rfr steigen zwischen 360 und 2880 erg mm^{-2} von 6×10^{-4} bis 4.5×10^{-3} an.

-für den r_1^s Diplonten:

- Die i n t e r g. Rfr steigen zwischen 120 und 480 erg mm^{-2} von 1.2×10^{-2} auf 6×10^{-1} sehr steil an und dann bis 1680 erg mm^{-2} sehr langsam auf über 9×10^{-1} .
- Die i n t r a g. Rfr steigen zwischen 80 und 1560 erg mm^{-2} von 1.3×10^{-3} auf 3.6×10^{-2} an.

-für den rad2-20 Diplonten:

- Die i n t e r g. Rfr steigen zwischen 20 und 120 erg mm^{-2} von 1.2×10^{-2} auf 3.9×10^{-2} an und nehmen dann wieder ab.
- Die i n t r a g. Rfr steigen zwischen 20 und 200 erg mm^{-2} von 4×10^{-4} auf 3.8×10^{-3} an.

Die Dosisabhängigkeit der Rfr läßt sich als Kinetik noch deutlicher erkennen, wenn die logarithmisch aufgetragenen Rfr über der logarithmierten UV-Dosis verglichen werden. Eine detaillierte Ableitung dieser Transformation (von einer semi-log in eine log-log Auftragung) findet sich bei ECKARDT (1974). Diese Transformation wird dort für UV-induzierte Mutationsraten angewendet.

Läßt sich die Dosisabhängigkeit einer Rekombinations- oder

Mutationsrate durch die Funktion

$$y = k \cdot x^n$$

annähern, erhält man nach Logarithmieren und anschließendem Vereinfachen der entstandenen Gleichung folgende Funktion:

$$y' = k' + nx'.$$

In der vereinfachten Gleichung ist k' eine Konstante. Ist n eine von der Dosis unabhängige Neigung der Kurve, ergibt sich bei doppelt logarithmischer Auftragung eine Gerade. Durch n wird eine Aussage über den Grad der Funktion ermöglicht, in der die Mutations- bzw. Rekombinationsrate von der UV-Dosis abhängt (ECKARDT 1974).

Mit Abb. 12 ist der Versuch unternommen worden, durch doppelt logarithmische Auftragung eine "Rekombinationskinetik" für die inter- und intragenischen Rekombinationsraten darzustellen. Die intragenischen Rekombinationsraten der RAD, r_1^S und rad2-20 Diplonten zeigen, wie auch die intergenischen Rfr des r_1^S Diplonten, prinzipiell eine zweiphasige, hyperbolische Ab-

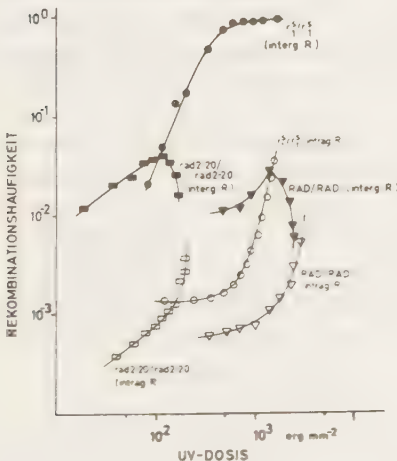


Abb. 12:

Rekombinationskinetik des RAD, r_1^S und rad2-20 Diplonten. Die Werte sind mit denen der Abb. 11 identisch.

hängigkeit von der UV-Dosis. Die i n t e r genischen Rekombinationsraten des RAD und rad2-20 Diplonten lassen hingegen eine wesentlich kompliziertere Dosisabhängigkeit erkennen.

Werden die Hyperbeläste der i n t r a genischen Rekombinationsraten des RAD, r_1^S und rad2-20 Diplonten annähernd als Geraden betrachtet, so lassen sich die n-Werte wie folgt bestimmen:

- Bei dem RAD Diplonten steigen die intragenischen Rfr bis etwa 1700 erg mm^{-2} mit einer Neigung von $n = 0.5$ an; bei höheren UV-Dosen ist $n = 3.4$.
- Bei dem r_1^S Diplonten zeigen die intragenischen Rfr bis 300 erg mm^{-2} keine Dosisabhängigkeit ($n = 0$); ab 800 erg mm^{-2} ist n jedoch 4.5.
- Bei dem rad2-20 Diplonten steigt die intragenische Rfr zwischen 40 und 170 erg mm^{-2} mit $n = 1$ an; bei UV-Dosen zwischen 170 und 200 erg mm^{-2} ist die Dosisabhängigkeit der Rfr durch $n = 5.6$ gekennzeichnet.

Aus diesen Ergebnissen (s. auch Abb. 11 und 12) geht hervor, daß die inter- und intragenischen Rekombinationsraten sich in ihrer Dosisabhängigkeit deutlich unterscheiden. Ähnlichkeiten und Unterschiede in dem Rekombinationsverhalten der Diplonten werden in der Diskussion näher behandelt (s. 4.3).

Ein Vergleich der Überlebensabhängigkeit von den Rekombinationsraten unterschiedlich UV-sensibler Stämme zeigt an, in welchem Maß rekombinogene Schäden gegenüber potentiellen Letalschäden repariert werden (WITKIN 1966 -- hier auf Rekombinationsraten angewendet). Ist die Effizienz, mit der rekombinogene Schäden im Vergleich zu potentiell letalen Schäden repariert werden, in allen Stämmen gleich, dann sollten sich die Kurven der Überlebensabhängigkeiten aller Stämme überlagern.

In Abb. 13 ist die Abhängigkeit der Rekombinationsraten von den Überlebensraten dargestellt. Nirgends fallen zwei Kurven genau aufeinander. Bei dem RAD und dem rad2-20 Diplonten liegen jedoch die Kurven der intergenischen, besonders aber der

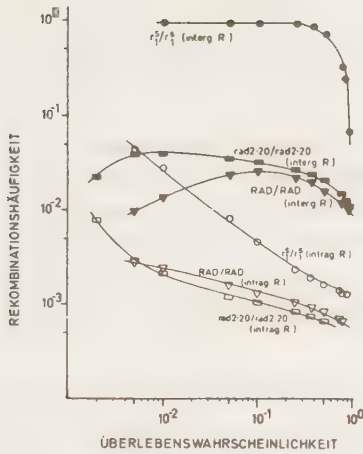


Abb. 13: Abhängigkeit der Rekombinationsraten des RAD, r_1^B und rad2-20 Diplonten von den Überlebensraten. Jeder Punkt ist ein Mittelwert aus 2-8 unabhängigen Versuchen.

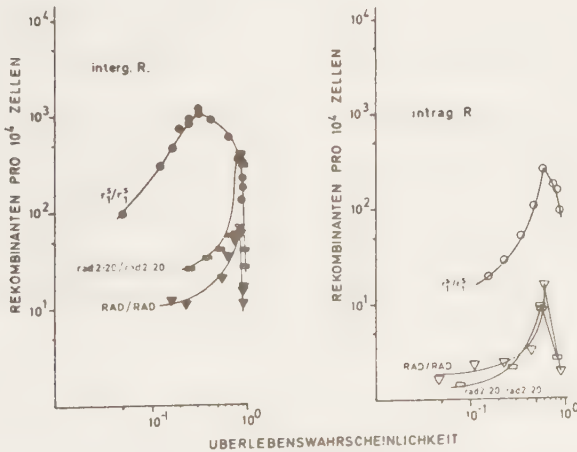


Abb. 14: Abhängigkeit der Rekombinantenzahlen des RAD, r_1^S und rad2-20 Diplonten von den Überlebensraten. Jeder Punkt entspricht einem experimentell ermittelten Wert.

intragenischen Rekombinationsraten eng zusammen. Der Kurvenverlauf von den Rekombinationsraten des r_1^S Diplonten zeigt deutlich, daß dieser Stamm im Vergleich zum Wildtyp RAD Diplonten präletale Schäden erheblich besser repariert als rekombinogene Schäden.

Die Abhängigkeit der Rekombinantenzahlen von den Überlebensraten sollte eine Aussage über die Abhängigkeit der Induktion von den Überlebensraten ermöglichen. Findet mit der Reparatur von potentiellen Letalschäden gleichzeitig eine Induktion von Rekombinationsereignissen statt, so ist eine Proportionalität zwischen den Überlebensraten und den Rekombinantenzahlen zu erwarten.

Abb. 14 stellt die Abhängigkeit der Rekombinantenzahlen von den Überlebensraten dar. Bei dem RAD und dem rad2-20 Diplonten unterscheiden sich die Überlebensabhängigkeiten der Rekombinantenzahlen nur in der Zahl der Rekombinanten, denn die Maxima liegen direkt übereinander. Für beide ist das Induktionsmaximum der intergenischen RE bei Überlebensraten von $8 \text{ bis } 9 \times 10^{-1}$, und das Induktionsmaximum der intragenischen RE im Bereich von $5 \text{ bis } 6 \times 10^{-1}$ Überlebende. In diesem Überlebensbereich (6×10^{-1}) liegt ebenfalls das Induktionsmaximum der intragenischen RE des r_1^S Diplonten. Die intergenischen RE des r_1^S Stammes, zeigen hingegen eine maximale Induktion bei 3×10^{-1} Überlebende.

Die Überlebensabhängigkeit der Rekombinationsraten (Abb. 13) und besonders der Rekombinantenzahlen (Abb. 14) des RAD und des rad2-20 Diplonten ist sehr ähnlich. Diese Tatsache scheint darauf hinzuweisen, daß die rekombinogenen Mechanismen und Prozesse nicht nur dosisabhängig sind (vgl. Abb. 10, 11 und 12), sondern möglicherweise außerdem von der Reparaturfähigkeit des jeweiligen Stammes abhängen, d.h von den Überlebensraten.

3.2.3. Einfluß von UV + PhR auf die Rekombinationsraten

Abb. 15 stellt den Einfluß von PhR auf die UV-induzierten Rekombinationsraten des RAD, r_1^S und rad2-20 Diplonten zusammenfassend dar. Bedingt durch den Kurvenverlauf ist eine Berechnung der jeweiligen DMF-Werte für die Rekombinationsraten nach PhR nicht möglich. Daher ist die Reduktion der Rfr durch PhR bei verschiedenen Überlebensraten der Diplonten als Q_{PhR} berechnet worden. Die Q_{PhR} Werte sind für die inter- und intra-genischen Rekombinationsraten in Tabelle 12 aufgeführt.

Die Wirkung von PhR auf die UV-induzierten i n t e r g e n i s c h e n Rfr läßt sich folgendermaßen charakterisieren:

- Bei dem RAD Diplonten liegen alle Werte nach PhR unter denen für UV-Induktion. Die Auswirkung von PhR ist nach UV-Bestrahlungen im Bereich von 1200-2400 erg mm⁻² am größten.

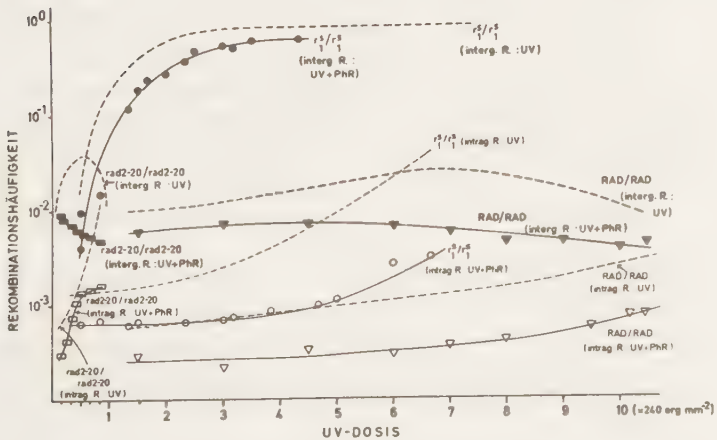


Abb. 15: Einfluß einer Nachbehandlung mit PhR auf die UV-induzierten Rekombinationsraten des RAD, r_1^S und rad2-20 Diplonten. Die UV-induzierten Raten sind zum Vergleich gestrichelt eingezeichnet. Jeder Punkt stellt einen Mittelwert aus 3-5 unabhängigen Versuchen dar.

Überlebens- rate	intergenische Rfr.			intragenische Rfr.		
	RAD	r_1^s	rad2-20	RAD	r_1^s	rad2-20
	Diplont	Diplont	Diplont	Diplont	Diplont	Diplont
8.0×10^{-1}	-1.60	-7.49	-1.33	-2.79	-2.11	---
7.5×10^{-1}	-1.64	-5.5	-1.75	-2.86	-2.24	---
5.0×10^{-1}	-2.19	-2.59	-2.73	-2.90	-2.54	-2.09
3.7×10^{-1}	-2.86	-1.95	-3.20	-2.88	-2.95	-1.79
2.5×10^{-1}	-3.31	-1.36	-3.86	-2.92	-3.43	-1.64
1.0×10^{-1}	-4.56	-1.22	-4.92	-3.09	-5.75	-1.50
5.0×10^{-2}	-4.51	-1.23	-5.57	-3.37	-7.45	-1.41
1.0×10^{-2}	-3.29	---	-7.22	-4.21	-11.66	-1.75
5.0×10^{-3}	-2.58	---	-7.80	-4.52	-14.55	-2.07
1.0×10^{-3}	---	---	-5.17	---	---	-5.03

Tabelle 12:

Werte für die inter- und intragenischen Rekombinationsraten des RAD, r_1^s und rad2-20 Diplonten. Die Werte sind aus den Kurven in Abb. 15 berechnet.

- Bei dem r_1^S Diplonten zeigen die Rfr-Kurven nach UV und nach PhR einen nahezu parallelen Verlauf. Somit ist der Einfluß von PhR auf die intergenischen Rfr fast im gesamten untersuchten Dosisbereich (320-960 erg mm^{-2}) gleich groß.
- Bei dem rad2-20 Diplonten wirkt sich die Nachbehandlung mit PhR nach einer UV-Dosis von 100-160 erg mm^{-2} am stärksten aus. Dieses Verhalten ähnelt dem des RAD Diplonten.

Auf die i n t r a genischen Rekombinationsraten wirkt eine PhR Nachbehandlung wie folgt:

- Die Rfr-Kurve des RAD Diplonten verläuft fast parallel unterhalb der Kurve der UV-induzierten Rfr in allen untersuchten Dosisbereichen.
- Bei dem r_1^S Diplonten ist die Wirkung von PhR nach höheren UV-Dosen (560 erg mm^{-2}) stärker als nach niedrigeren UV-Dosen.
- Bei dem rad2-20 Diplonten vermag PhR nach UV-Dosen von 120 erg mm^{-2} nur eine geringfügige Reduktion der intragenischen Rfr zu bewirken. Nach höheren UV-Dosen werden jedoch sogar die stark ansteigenden UV-induzierten intragenischen Rfr auf ein gleichbleibendes Niveau (1.5×10^{-3}) reduziert.

Aus Tabelle 12 geht hervor, daß der Einfluß von PhR auf die UV-induzierten Rekombinationsraten für die inter- und intragenischen Rfr unterschiedlich groß ist. Ein Vergleich der Q_{PhR} Werte für die jeweiligen Rekombinationsraten mit den zugehörigen Q_{PhR} Werten für die Überlebensraten (Tab. 5) läßt folgende Schlüsse zu:

1. Eine Reduktion der Rekombinationsraten ist stammspezifisch, unterschiedlich für inter- und intragenische Rekombinationsraten, und hängt sowohl von der applizierten UV-Dosis als auch von der durch die UV-Bestrahlung

erreichte Inaktivierung ab.

2. Wird der Einfluß von PhR auf die Rfr und U bei demselben Überlebensniveau (d.h., identische Inaktivierung nach einer UV-Bestrahlung) verglichen, so ist nach PhR die Reduktion der UV-induzierten Rfr geringer als die zugehörige Erhöhung der Überlebensraten.

In Abb. 16 wird die Abhängigkeit der Reparatur rekombogener Schäden von der Reparatur präletaler Schäden nach PhR dargestellt. (Zum Vergleich ist Abb. 13 danebengestellt.) Für die *i n t e r* genischen Rekombinationsraten geht aus diesem Vergleich Folgendes hervor:

- Bei dem RAD Diplonten hat sich die Relation der Reparatur von präletalen zu rekombinogenen Schäden nach UV-Bestrahlung durch PhR zugunsten der Reparatur von rekombinogenen Schäden verschoben.
- Dieselbe Verschiebung läßt sich bei dem rad2-20 Diplonten

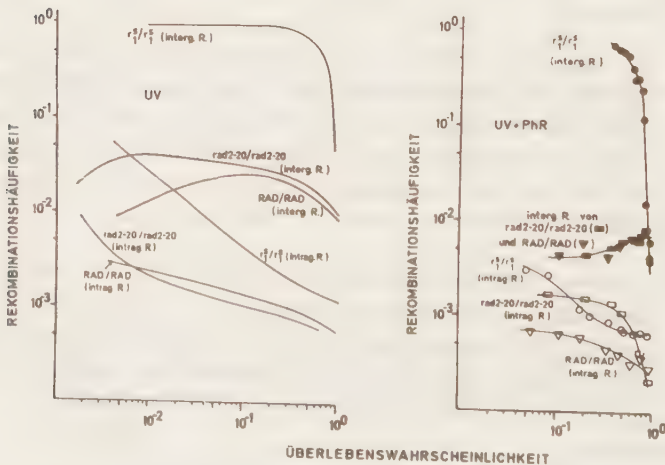


Abb. 16:

Abhängigkeit der Rekombinationsraten des RAD, r_1^s und rad2-20 Diplonten nach PhR von den Überlebensraten nach PhR. Jeder Punkt stellt einen Mittelwert zwischen 2 und 5 unabhängigen Versuchen dar.

erkennen, bei dem r_1^S Diplonten jedoch nur in Bereichen höherer Inaktivierung ($U < 6 \times 10^{-1}$).

Die intragenischen Rfr des RAD und des r_1^S Diplonten zeigen nach PhR eine ähnliche Verschiebung der spezifischen Reparatureffizienz wie die intergenischen Rfr. So werden auch in diesem Fall bei gleicher Überlebensrate durch PhR mehr rekombinogene Schäden als ohne PhR repariert. Im Gegensatz dazu zeigt die Überlebensabhängigkeit der intragenischen Rfr des rad2-20 Diplonten nach PhR eine Verschiebung zugunsten der Reparatur von präletalen Schäden. Hier scheint die Reparatur von potentiellen Letalschäden relativ zur Reparatur von rekombinogenen Schäden effektiver zu sein. (Ein ähnliches Verhalten erhielt ECKARDT (1974) für die Reparatur von prämutativen Schäden des rad2-20 Haplonten.)

3.2.4. Einfluß von UV + LHR auf die Rekombinationsraten

In Abb. 17 ist der Einfluß von LHR auf die UV-induzierten

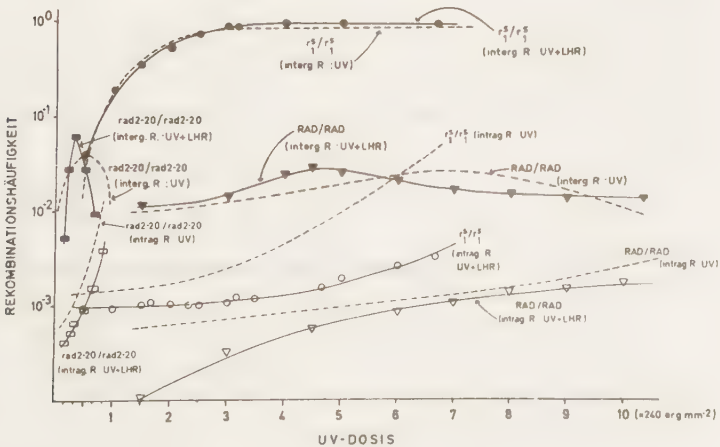


Abb. 17: Einfluß von LHR auf die UV-induzierten Rekombinationsraten des RAD, r_1^S und rad2-20 Diplonten. Die UV-induzierten Rfr sind gestrichelt; Jeder Punkt ist ein Mittelwert aus 2-4 unabhängigen Versuchen.

Überlebens- rate	intergenische Rfr.			intragenische Rfr.		
	RAD Diplont	r_1^S Diplont	rad2-20 Diplont	RAD Diplont	r_1^S Diplont	rad2-20 Diplont
9.0×10^{-1}	---	-2.24	---	---	-1.28	---
8.0×10^{-1}	+1.16	-1.92	---	-3.04	-1.28	---
7.5×10^{-1}	+1.20	-1.74	---	-2.50	-1.36	---
5.0×10^{-1}	+1.69	-1.25	-2.34	-1.58	-1.50	-1.64
3.7×10^{-1}	+1.30	-1.12	-1.33	-1.31	-1.77	-1.67
2.5×10^{-1}	+1.05	-1.01	+1.19	-1.21	-2.05	-1.77
1.0×10^{-1}	-1.50	+1.10	+1.72	-1.20	-3.17	-1.91
5.0×10^{-2}	-1.49	+1.08	+1.65	-1.19	-4.68	-2.00
1.0×10^{-2}	+1.04	---	-1.18	-1.50	-8.75	-2.62
5.0×10^{-3}	+1.43	---	-1.77	-1.64	-10.70	-3.06
1.0×10^{-3}	---	---	-3.38	---	---	-4.27

Tabelle 13:

Q_{LHR} Werte für die inter- und intragenischen Rekombinationsraten des RAD, r_1^S und rad2-20 Diplonten. Die Werte sind aus den Kurven in Abb. 17 berechnet.

Rfr dargestellt. Nach LHR werden die *interg.* Rfr des RAD und des *rad2-20* Diplonten z.T. über die UV-induzierten Raten hinaus erhöht. Diese Erhöhung tritt nach einer jeweils niedrigeren UV-Dosis auf als die höchste UV-Induktion. Während des LHR werden in diesen Stämmen anscheinend nicht nur rekombinogene Schäden repariert, sondern auch zusätzlich Rekombinationsereignisse induziert (Abb. 18). Bei dem r_1^S Diplonten fallen zwar die Kurven für UV-induzierte *interg.* Rfr mit und ohne LHR zusammen, jedoch werden auch in diesem Stamm RE durch LHR induziert.

Auf die *intragenischen* Rfr der drei Diplonten wirkt LHR durchweg reduzierend.

Die Q_{LHR} Werte für die inter- und intragenischen Rfr sind aus den Kurven in Abb. 17 berechnet worden und in der Tabelle 13 aufgeführt. Der unterschiedliche Einfluß von LHR auf die *intergenischen* Rfr erschwert einen Vergleich zwischen den Stämmen. Aus einer Gegenüberstellung der Q_{LHR} Werte für die Überlebenden (Tab. 7) und für die Rfr (Tab. 13) ist ersichtlich, daß sich

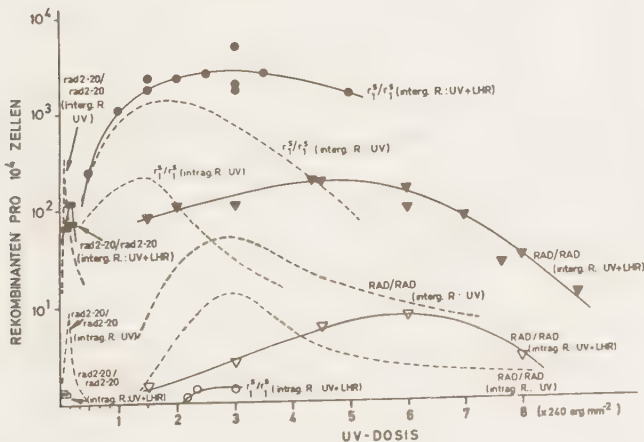


Abb. 18: Einfluß von LHR auf die UV-induzierten Rekombinationsereignisse des RAD, r_1^S und *rad2-20* Diplonten. Jeder Punkt stellt einen experimentell ermittelten Wert dar. Die UV-induzierten RZ sind gestrichelt gezeichnet.

LHR z.T. auf die Überlebensraten und die Rfr in gleichem Maße auswirkt (nach einer Inaktivierung auf 8×10^{-1} bis 10^{-1} Überlebende).

Die Effektivität, mit der rekombinogene Schäden nach LHR im Vergleich zu präletalen Schäden nach LHR repariert werden, ist in Abb. 19 dargestellt. (Als Vergleich ist Abb. 13 mit den entsprechenden Werten ohne LHR daneben abgebildet.) An den *inter*genischen Rfr ist erkennbar, daß eine deutliche Induktion von Rekombinationsereignissen bereits bei sehr hohen Überlebensraten stattfindet. Im Zusammenhang mit Abb. 18 sind somit Hinweise dafür gegeben, daß die Reparatur während des LHR nicht nur präletale Schäden beseitigt, sondern mit größter Wahrscheinlichkeit zusätzliche rekombinogene Schäden verursacht. Im Gegensatz zu einer induzierenden Wirkung von LHR auf die intergenischen Rfr, bewirkt LHR bei den 3 Stämmen eine Reduktion der *intra*genischen Rfr. Bei dem RAD Diplonten

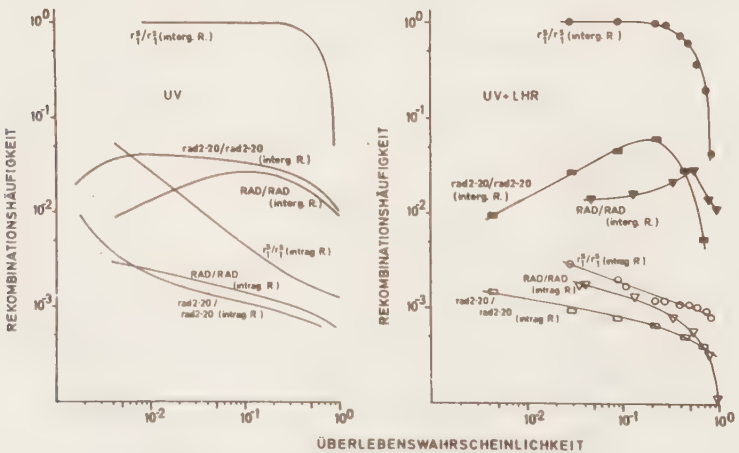


Abb. 19:

Abhängigkeit der Reparatur rekombinogener Schäden nach LHR von der Reparatur präletaler Schäden nach LHR für den RAD, r_1^8 und rad2-20 Diplonten. Jeder Punkt stellt einen Mittelwert aus 2-4 unabhängigen Versuchen dar.

läßt sich dieser Einfluß allerdings nur in Überlebensbereichen $> 3 \times 10^{-1}$ feststellen. Bei niedrigeren Überlebensraten steht die Reparatur von präletalen zu rekombinogenen Schäden im gleichen Verhältnis mit LHR wie ohne LHR.

3.2.5. Einfluß von UV + Phr + LHR auf die Rekombinationsraten

Die Auswirkung einer doppelten Nachbehandlung auf die UV-induzierten Rekombinationsraten des RAD, r_1^S und rad2-20 Diplonten ist in Abb. 20 dargestellt. Daraus ergibt sich

- für den RAD Diplonten:

Die PhR+LHR Werte der *i n t e r g e n i s c h e n* Rfr sind bis 1920 erg mm^{-2} niedriger als die UV-induzierten Rfr. Von dieser Dosis an bleiben sie auf dem Wert von 2.2×10^{-2} und liegen somit höher als die dann rasch abfallenden UV-induzierten intergenischen Rfr (vgl. auch Abb. 21).

Bei den *i n t r a g e n i s c h e n* Rfr ist die anfängliche Reduktion der UV-induzierten Rfr zuerst größer als die der intergenischen Rfr. Mit zunehmender UV-Dosis steigen die intragenischen Rfr nach PhR+LHR an und liegen schließlich im Bereich der intrag. Rfr nach LHR.

- für den r_1^S Diplonten:

Die PhR+LHR Werte der *i n t e r g.* Rfr sind gegenüber denen nach PhR (Abb. 15) kaum reduziert, obwohl die RZ nach PhR+LHR deutlich über denen nach UV liegen (Abb. 21). Die UV-induzierten *i n t r a g.* Rfr sind nach PhR+LHR im gesamten Dosisbereich reduziert, jedoch nicht so stark wie nach PhR allein. Mit zunehmender UV-Dosis steigt die Reduktion der intragenischen Rfr durch PhR+LHR an.

- für den rad2-20 Diplonten:

Bei diesem Stamm werden die UV-induzierten *i n t e r g.* Rfr auf Werte reduziert, die der spontanen Rfr entsprechen. Die *i n t r a g.* Rfr sind ebenfalls im gesamten Dosisbereich nach PhR+LHR erheblich niedriger als ohne nachbehandlung.

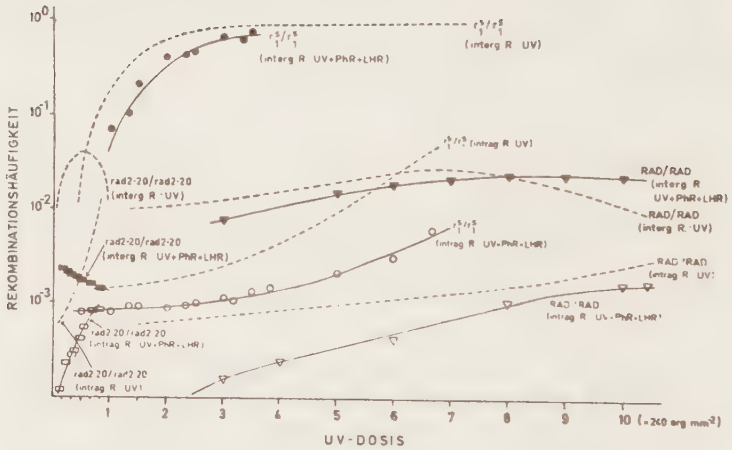


Abb. 20: Einfluß von PhR+LHR auf die UV-induzierten Rekombinationsraten der RAD, r_1^s und rad2-20 Diplonten. Die UV-induzierten Raten sind gestrichelt eingezeichnet. Jeder Punkt stellt einen Mittelwert aus 3-5 unabhängigen Versuchen dar.

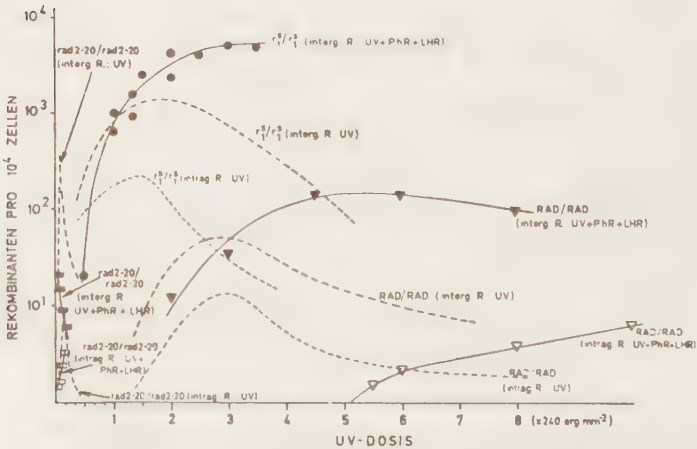


Abb. 21: Einfluß von PhR+LHR auf die UV-induzierten Rekombinationsereignisse der RAD, r_1^s und rad2-20 Diplonten. Die UV-induzierten RZ sind gestrichelt eingezeichnet. Jeder Punkt entspricht einem experimentell ermittelten Wert.

Die Doppelbehandlung scheint sich auf die UV-induzierten inter- und intrag. Rfr des rad2-20 Diplonten synergistisch³⁾ auszuwirken. Auf eine additive⁴⁾ Wirkung der Einzelbehandlungen hingegen weist die Reduktion der UV-induzierten inter- und intragenischen Rfr des RAD, sowie der UV-induzierten intrag. Rfr des r_1^S Diplonten hin.

Eine Gegenüberstellung der $Q_{PhR+LHR}$ Werte für die Rekombinationsraten (Tab. 14) mit den entsprechenden Werten für die Überlebensraten (Tab. 9) ermöglicht einen Vergleich zwischen der Reparatur von präletalen und rekombinogenen Schäden:

- Bei dem RAD Diplonten entspricht die Reduktion der Rekombinationsraten durch PhR+LHR nicht der zugehörigen Erhöhung der Überlebensraten durch PhR+LHR. Die Nachbehandlungen erhöhen die Überlebensraten stets, während sie die Rekombinationsraten teils reduzieren und teils erhöhen.
- Bei dem r_1^S Diplonten werden die inter. Rfr für $\bar{U} > 5 \times 10^{-1}$ durch PhR+LHR mehr reduziert, als die zugehörigen Überlebensraten erhöht werden. Bei den intragenischen Rfr entspricht die Reduktion nach PhR+LHR der zugehörigen Erhöhung der Überlebensraten bei $\bar{U} > 5 \times 10^{-2}$.
- Bei dem rad2-20 Diplonten nimmt die Erhöhung der Überlebensraten und die Reduktion der UV-induzierten inter- und intrag. Rfr nach PhR+LHR mit steigender UV-Dosis zu. Für $\bar{U} > 5 \times 10^{-2}$ ist die Reparatur von rekombinogenen Schäden größer als von präletalen Schäden; bei $\bar{U} < 5 \times 10^{-2}$ ist die Reparatur von präletalen Schäden größer.

In Abb. 22 ist die Abhängigkeit der Reparatur rekombinogener Schäden von der Reparatur präletaler Schäden nach PhR+LHR dargestellt. Abb. 13 ist ebenfalls als Vergleich abgebildet.

3) Sind A und B zwei Prozesse, dann ist ihre Wirkung synergistisch, wenn die Wirkung von A+B größer ist als die Wirkung von A + der Wirkung von B (vgl. GAME und COX 1973).

4) Ist die Summe der einzelnen Wirkungen von A und B (s. 3)) mit der Wirkung von A+B identisch, sind die Wirkungen additiv (vgl. GAME und COX 1973).

Überlebens- rate	intergenische Rfr.			intragenische Rfr.		
	RAD Diplont	r_1^s Diplont	rad2-20 Diplont	RAD Diplont	r_1^s Diplont	rad2-20 Diplont
8.0×10^{-1}	-1.97	---	---	-7.45	-1.59	---
7.5×10^{-1}	-1.82	---	---	-6.36	-1.66	---
5.0×10^{-1}	-1.39	-2.96	-9.14	-3.65	-1.78	-4.32
3.7×10^{-1}	-1.33	-2.00	-10.90	-2.87	-1.99	-4.16
2.5×10^{-1}	-1.09	-1.58	-12.87	-2.28	-2.18	-4.04
1.0×10^{-1}	-1.08	---	-16.00	-1.73	-2.96	-4.04
5.0×10^{-2}	-1.05	---	-17.90	-1.61	-4.21	-4.00
1.0×10^{-2}	+1.63	---	-21.65	-1.60	-6.66	-4.88
5.0×10^{-3}	+2.22	---	-22.90	-1.65	-7.05	-5.57
1.0×10^{-3}	---	---	-15.15	---	---	-9.63

Tabelle 14:

$Q_{PhR+LHR}$ Werte für die inter- und intragenischen Rekombinationsraten des RAD, r_1^s und rad2-20 Diplonten. Die Werte sind aus den Kurven in Abb. 20 berechnet.

Durch PhR+LHR wird ein größerer Anteil von intergenischen rekombinogenen Schäden des r_1^S und des rad2-20 Diplonten in hohen Überlebensbereichen repariert, als ohne Nachbehandlung. Bei den intragenischen rekombinogenen Schäden tritt bei höheren Überlebensraten ($>5 \times 10^{-1}$ für den rad2-20, $>10^{-1}$ für den r_1^S Diplonten) eine erhöhte Reparatur von rekombinogenen Schäden relativ zu den präletalen Schäden auf. In den jeweils niedrigeren Überlebensbereichen entspricht die Relation der Reparatur beider Schadensarten (rekombinogen und präletal) nach PhR+LHR der Relation ohne Nachbehandlung. Im Gegensatz zu dem r_1^S und dem rad2-20 Diplonten werden bei dem RAD Diplonten bei $U > 5 \times 10^{-1}$ offenbar präletale Schäden bevorzugt repariert: die inter- und intragenischen Rfr nach PhR+LHR liegen in diesem Überlebensbereich höher als die entsprechenden Werte ohne PhR+LHR.

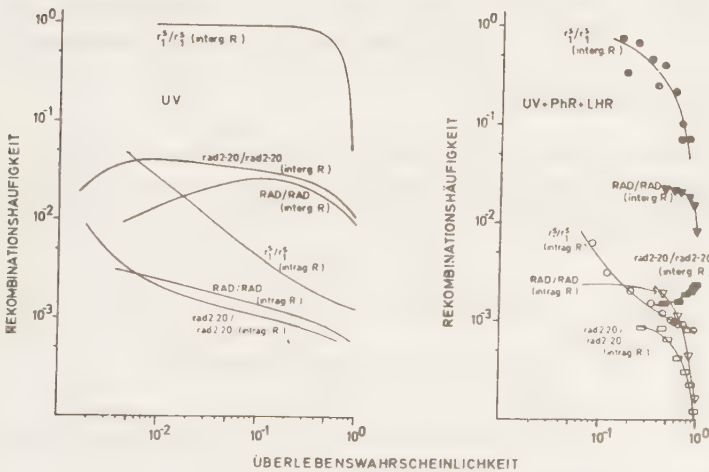


Abb. 22:

Abhängigkeit der Reparatur rekombinogener Schäden des RAD, r_1^S und rad2-20 Diplonten von der Reparatur der präletalen Schäden nach PhR+LHR. Jeder Punkt stellt einen experimentell ermittelten Wert dar.

3.3. Spontane Rekombinationsraten

3.3.1. Methodisches

Für die Bestimmung der spontanen mitotischen Rekombinationsraten wurde der Fluktuationstest angewendet, den LURIA und DELBRÜCK (1943) für die Bestimmung von spontanen Mutationsraten entwickelt hatten. Mit diesem Test (s. 2.5.1.) läßt sich die Wahrscheinlichkeit feststellen, mit der ein spontanes Rekombinationsereignis stattfindet. Dabei wird nicht von der Zahl der auftretenden Rekombinationsereignisse ausgegangen, sondern von einigen unter vielen Parallelansätzen, die kein spontanes Ereignis aufweisen (sogenannte Nullereignisse). Wird die Wahrscheinlichkeit nur auf die Zahl der auftretenden Ereignisse bezogen, liegt ein methodischer Fehler vor. Es läßt sich nämlich nachträglich nicht mehr feststellen, ob die aufgewachsenen Rekombinanten unmittelbar aus einem Rekombinationsereignis hervorgegangen, oder durch Teilung aus einer bereits rekombinierten Zelle entstanden sind.

Spontane Rekombinationsereignisse treten verhältnismäßig selten auf. Zu ihrer Berechnung kann daher die POISSON-Verteilung benutzt werden:

$$P_{(n)} = \frac{e^{-m} m^n}{n!}$$

n = Anzahl der Ereignisse pro Ansatz

m = Mittelwert der Ereignisse

$P_{(n)}$ = erwartete Häufigkeit von Ansätzen mit n Ereignissen

Der Fluktuationstest bezieht sich, wie oben erwähnt, auf die Zahl der Nullereignisse. Dies bedeutet für die POISSON-Verteilung, daß $n = 0$, wodurch folgende Vereinfachung entsteht:

$$P_{(0)} = e^{-m} = \frac{N_0}{N}$$

N_0 = Zahl der Ansätze ohne Rekombinationsereignisse
 N = Gesamtzahl der Ansätze

Somit läßt sich m allein aus der Anzahl der Nullereignisse bestimmen.

LURIA und DELBRÜCK (1943) definierten die spontane Mutationshäufigkeit als Rate pro Zelle und Generation, d.h sie bezogen m sowohl auf die Zellzahl als auch auf die Generationszahl. KONDO (1972) hingegen, bezieht m nur auf die Zellzahl und definiert somit die spontane Mutationshäufigkeit als Rate pro Zellteilung.

Dieser letzere Bezugspunkt scheint für die spontanen Rekombinationsraten sinnvoll zu sein, da diese Ereignisse nach neueren Untersuchungen mit der DNS-Replikation zusammenhängen können (RADDING 1973). Somit ergibt sich folgende Berechnung der spontanen Rekombinationshäufigkeiten:

$$Rfr_{sp} = \frac{m - M_0}{Z - Z_0}$$

M_0 und Z_0 sind die Zahl der Ereignisse zu Versuchsbeginn bzw. die Zahl der Zellen zu Versuchbeginn. Z und m sind die entsprechenden Werte am Ende des Versuchs. M_0 und Z_0 sind im Vergleich zu m und Z sehr klein, und können daher bei der Berechnung vernachlässigt werden.

3.3.2. Die spontanen Rekombinationsraten: Ergebnisse

Die spontanen mitotischen Rekombinationsraten der Diplonten sind in Tabelle 15 zusammengefaßt.

Bei den spontanen *i n t e r* genischen Rfr zeigen die 4 Diplonten dasselbe Verhältnis wie bei den UV-induzierten Rekombinationsraten:

- RAD und rad2-20 Diplonten erzeugen spontan ähnlich viele Rekombinationsereignisse.

	RAD Diplont	r_1^s Diplont	r_2^s Diplont	rad2-20 Diplont
interg. RE pro 10^3 Z	3.2 (2.5-4.2)	30 (28-33)	0	2.74 (1.92-4.2)
intrag. RE pro 10^4 Z	1.6 (1.4-1.9)	6.2 (5.3-7.2)	0	3.5 (2.2-4.6)

Tab. 15:

Die spontanen mitotischen Rekombinationsraten des RAD, r_1^s , r_2^s und rad2-20 Diplonten. Unter den Raten sind die Extremwerte der Versuche in Klammern angegeben, da pro Stamm nur drei Versuche durchgeführt worden sind.

- Der r_1^s Diplont erzeugt bereits spontan mehr Rekombinanten als der RAD oder der rad2-20 Diplont.
- Bei dem r_2^s Diplonten lassen sich auch keine spontanen mitotischen Rekombinationsereignisse feststellen.

Bei den i n t r a genischen Rekombinationsraten liegen die spontanen Werte der UV-sensiblen r_1^s und rad2-20 Diplonten über denen des Wildtyp RAD Diplonten. Bei dem r_2^s Diplonten konnten keine spontanen intragenischen Rekombinanten festgestellt werden.

Die spontanen Rekombinationsraten, die mit dem Fluktuationstest ermittelt wurden, stimmen relativ gut mit den Werten überein, die von den Ausgangssuspensionen der Bestrahlungsversuche errechnet wurden. Zum Vergleich sind diese Rekombinationsraten in Tabelle 16 aufgeführt.

Bei dem r_2^s Diplonten scheinen sehr selten spontane intergenische Rekombinationsereignisse stattzufinden. Möglicherweise sind es jedoch auch Mutationsereignisse -- der Größenordnungsbereich würde dafür sprechen.

	RAD Diplont	r_1^s Diplont	r_2^s Diplont	rad2-20 Diplont
interg. RE pro 10^3 Z	6.77	25.8	0.045	5.02
intrag. RE pro 10^4 Z	2.23	6.66	0	7.18

Tab. 16:

Zusammenstellung der spontanen Rekombinationsraten des RAD, r_1^s , r_2^s und rad2-20 Diplonten, die von dem Anteil spontan auftretender Rekombinanten in der Ausgangssuspension von Bestrahlungsversuchen berechnet wurden. Die aufgeführten Werte sind aus 9 unabhängigen Versuchen gemittelt.

3.4. Einfluß von UV, PhR, LHR und PhR+LHR auf die Mutationsraten.

3.4.1. Methodisches

Bei der Bestimmung der UV-induzierten Mutationsraten handelt es sich um die Ermittlung der UV-induzierten Reversionsraten von einer Adenin- bzw. Histidinauxotrophie zur -prototrophie. Für die Erfassung der recht selten auftretenden Mutationsereignisse ist dieser Umstand günstig, da wie bei den intragenischen Rekombinationsraten (s. 3.2.1. und 2.6.2) eine selektive Methode angewendet werden kann. Die Vorteile und Fehlerquellen dieser Methode sind bereits unter 3.2.1. erwähnt worden.

Um die Mutationsraten zur Adenin- und Histidinprototrophie (in dieser Arbeit als ADE und HIS Mutationsraten bezeichnet) zu untersuchen, wurden UV-sensible, auxotrophe Diplonten hergestellt, die in allen verwendeten Markern homozygot sind (Tab. 1). Sie werden als h-rad Stämme bezeichnet, um den Vergleich zwischen diesen Stämmen und den für die auxotrophen Marker teilweise heterozygoten Stämme im Text zu erleichtern.

Mutationsereignisse treten im Vergleich zu Rekombinationsereignissen spontan relativ selten auf (10^{-8} bis 10^{-7} im Gegensatz zu 10^{-4} bis 10^{-3}). Daher ist es notwendig, für die Bestimmung der UV-induzierten Mutationsraten hohe Titer zu bestrahlen. Durch hohe Zelltitel ergibt sich aber das bereits unter 3.1.1. erwähnte Problem der Abschattung. Vorversuche zeigten allerdings, daß bei den h-Diplonten ein Titer von 10^6 Z/ 0.1 ml meistens für die Bestimmung der UV-induzierten Mutationsraten genügte. Dieser Umstand erwies sich als günstig, denn die Mutationsversuche wurden lediglich zur Absicherung der Rekombinationsversuche durchgeführt. Für die Aufnahme von Inaktivierungskurven, sowie für die Ermittlung der UV-induzierten Mutations- und Rekombinationsraten, konnten somit einheitliche Titer von 10^6 Z/ 0.1 ml bestrahlt werden. Bei sehr niedrigen Mutationsraten mußten jedoch höhere Titer bestrahlt werden. Die so erhaltenen Mutationsraten wurden dann aber auf die "wirksame Dosis"

bezogen, die für 10^6 Z/ 0.1 ml ermittelt worden war.

Berechnungen:

Die Berechnung der Mutationsraten (Mfr) ergibt sich aus der Bestimmung der Mutantenzahlen und der Bestimmung der Überlebensraten, wie sie in 3.1.1. dargestellt ist. Da für die Ermittlung der UV-induzierten Mfr teilweise ein dichter Titer (bis 3×10^7 Z/ 0.1 ml) bestrahlt wurde als für die Bestimmung der Überlebenden (10^6 Z/ 0.1 ml), sind alle Mfr auf die wirksame Dosis bezogen (s.o.).

Die Inaktivierungskurven der h-rad Stämme unterscheiden sich z.T. geringfügig von denjenigen der rad Stämme (Abb. 23). Die Mfr sind auf die Überlebensraten der h-rad Stämme bezogen.

Für die Berechnung der UV-induzierten Mutationsraten (Mfr) wird der Anteil an UV-induzierten Mutationsereignissen (M) mit der Gesamtzahl teilungsfähiger Zellen (Z) nach der Bestrahlung

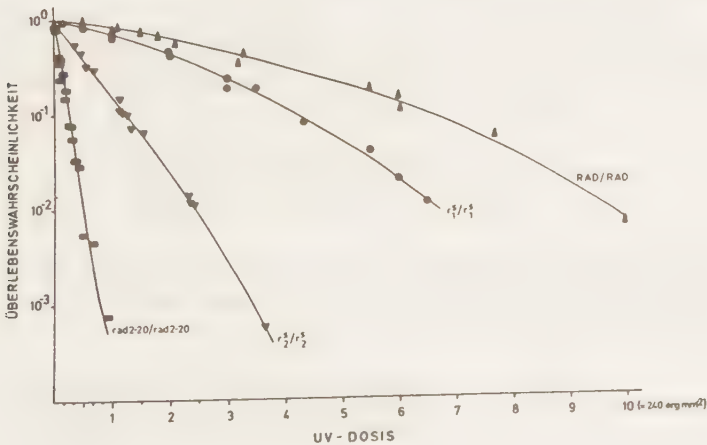


Abb. 23: UV-Inaktivierung der h-rad Diplonten (h-RAD, h-r₁^s, h-r₂^s und h-rad2-20). Jeder Punkt entspricht einem experimentell ermittelten Wert.

verglichen. (D_x bedeutet im Rahmen dieser Arbeit für die Mutationsversuche immer die wirksame Dosis, die meistens, aber nicht immer mit der Bestrahlungsdosis identisch ist.)

$$Mfr(D_x) = \frac{M(D_x) - M(D_0) \cdot U(D_x)}{Z(D_0) \cdot U(D_x)}$$

Für die Berechnung der Mutationsraten nach UV-Bestrahlung + Nachbehandlung (R), gilt die entsprechende Formel:

$$Mfr(D_x+R) = \frac{M(D_x + R) - M(D_0 + R) \cdot U(D_x + R)}{Z(D_0 + R) \cdot U(D_x + R)}$$

Ein Vergleich der Induktionsfähigkeit von Mutationsereignissen bei verschiedenen Stämmen ist durch den DRF_{Mfr} und den Q_{Mfr} möglich (s. auch 3.1.1. und 3.2.1.). Mit DRF_{Mfr} werden die jeweiligen wirksamen UV-Dosen bei gleicher Mutationsrate der Stämme verglichen, während mit Q_{Mfr} die jeweiligen Mutationsraten bei der gleichen UV-Dosis verglichen werden.

$$DRF_{Mfr} = \frac{D_x \text{ bei } Mfr \equiv Y \text{ für h-RAD}}{D_x \text{ bei } Mfr \equiv Y \text{ für h-rad}}$$

$$Q_{Mfr} = \frac{Mfr \text{ bei } D_x \equiv Y \text{ für h-RAD}}{Mfr \text{ bei } D_x \equiv Y \text{ für h-rad}}$$

Das Ausmaß des Einflusses von Nachbehandlungen (PhR, LHR und PhR+LHR) kann für die Mutationsraten sowohl als DMF wie auch durch Q_R ausgedrückt werden (vgl. 3.2.1.).

$$DMF_{D_x+R} = \frac{\text{Dosis bei } Mfr(D_x + R) \text{ für Stamm Y}}{\text{Dosis bei } Mfr(D_x) \text{ für Stamm Y}}$$

$$Q_{R-Mfr} = \frac{Mfr(D_x + R) \text{ für Stamm Y}}{Mfr(D_x) \text{ für Stamm Y}}$$

Als Nachweis einer Induktion von Mutationsereignissen durch UV-Bestrahlung wird die Mutantenzahl (MZ) berechnet. Hierbei wird die Abtötung durch die UV-Bestrahlung nicht berücksichtigt (s. auch 3.2.1.).

$$MZ(D_x) = \frac{M(D_x) - M(D_0) \cdot U(D_x)}{Z(D_0)}$$

Die Mutantenzahlen wurden alle auf Zellpopulationen von 10^8 Zellen normiert, um "1" als geringste Mutantenzahl zu erhalten und alle Versuche miteinander vergleichen zu können.

Im Zusammenhang mit einer geringen Versuchszahl liegen teilweise erhebliche Streuungen und/oder nur wenige Werte vor. Daher konnten, besonders für die Werte UV+Nachbehandlung nicht immer die DMF und Q_R Werte berechnet werden. Aus den Mutationsversuchen ist hauptsächlich nur eine Angabe von Tendenzen möglich. Die Ergebnisse genügen somit jedoch den Anforderungen von Absicherungsversuchen für die Rekombinationsexperimente.

Für die HIS Mutationsraten liegen -- vor allem bei den Nachbehandlungen -- noch weniger Werte vor als für die ADE Mfr. Beide Reversionsraten werden in den Induktionskurven dargestellt. Die Ergebnisse der Nachbehandlungen werden aber nur für die ADE Revertanten aufgeführt.

3.4.2. Einfluß von UV auf die Mutationsraten

3.4.2.1. Nachweis einer Induktion durch UV-Bestrahlung

Die in Abb. 24 dargestellten Mutationsereignisse sind der Beweis dafür, daß durch UV-Bestrahlung Mutanten induziert und nicht selektioniert werden. Bei den 4 Diplonten ist die Induktion von unterschiedlichem Ausmaß. Die Kurven in Abb. 24 weisen folgende Charakteristika auf:

- Der h-RAD Diplont zeigt für ADE und HIS eine erhebliche Induktion (um das 10^3 -fache für ADE bzw. 10-fache für HIS gegenüber der unbestrahlten Kontrolle). Nach einer UV-Dosis von 1200-1440 erg mm^{-2} (entsprechend den Überlebensraten von $1,5 \times 10^{-1}$ bis 2×10^{-1}) findet die stärkste Induktion der ADE Revertanten statt.
- Der h-r₁^S Diplont weist gegenüber dem Wildtyp-Diplonten eine erhöhte Induktion von Mutationsereignissen auf. Für ADE beträgt die stärkste Induktion das 10^4 -fache der un-

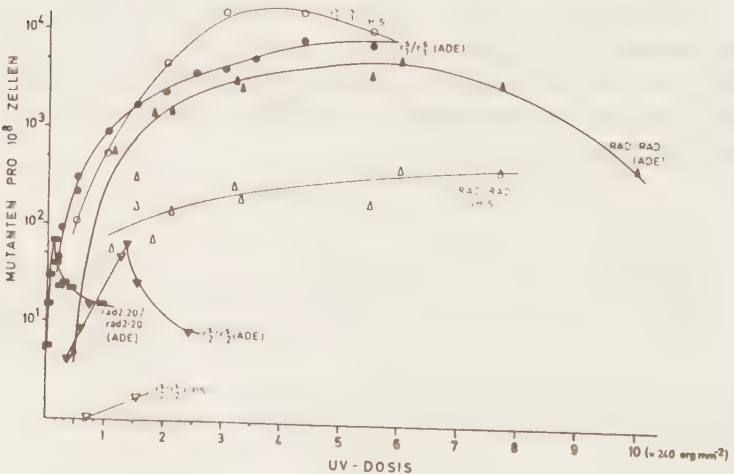


Abb. 24:

Dosisabhängigkeit der auftretenden Mutationsereignisse des h-RAD, h-r₁^S, h-r₂^S und h-rad2-20 Diplonten. Jeder Punkt entspricht einem experimentell ermittelten Wert.

bestrahlten Kontrollen nach einer UV-Dosis von 840-1320 erg mm⁻² (entsprechend 3×10^{-2} bis 1.7×10^{-1} Überlebenden). Für HIS liegt die größte Induktion im Bereich von 480-1080 erg mm⁻² (entsprechend 8×10^{-2} bis 4.5×10^{-1} Überlebenden). Die Mutantenzahlen für HIS sind nach UV-Dosen >240 erg mm⁻² mindestens um das 10-fache größer als bei dem h-RAD Diplonten, und liegen sogar über den ADE Werten.

- Der h-r₂^s Diplont zeigt gegenüber dem Wildtyp-Diplonten eine reduzierte Induktion von Mutanten. Nach 320 erg mm⁻² (entsprechend 6×10^{-2} Überlebenden) ist die größte Induktion der ADE Revertanten des h-r₂^s Diplonten. Diese Werte liegen jedoch noch unter denen des h-RAD Diplonten. Die Werte der HIS Revertanten lagen bis auf zwei Punkte unter 1 Mutante pro 10⁸ Zellen und somit weit unter denen des Wildtyp-Stamms.
- Bei dem h-rad2-20 Diplonten liegt bereits nach 24 erg mm⁻² (entsprechend 3.5×10^{-1} Überlebenden) eine Induktion der ADE Mutanten um das 10-fache der unbestrahlten Kontrolle vor. In diesem Dosisbereich konnte für den h-RAD Diplonten noch keine Induktion nachgewiesen werden, und die ADE Mutantenzahlen des h-r₁^s Diplonten sind bei dieser UV-Dosis 50-mal kleiner. Aus den wenigen Versuchen ließen sich für den h-rad2-20 Diplonten noch keine HIS Mutantenzahlen ermitteln. Für diese Versuche wurden die Vorkulturen nicht selektioniert. Dadurch enthielten manche Ausgangs-suspensionen (s. 2.5.2.) einen sehr hohen Anteil an Mutanten. Eine Berechnung der Mutantenzahlen ist in solchen Fällen nicht möglich.

3.4.2.2. Einfluß von UV auf die Mutationsraten

Die Mutationsraten der verschiedenen h-rad Diplonten sind in Abb. 25 dargestellt. In Abhängigkeit von der UV-Dosis steigen die Mfr des h-RAD, h-r₁^s, h-r₂^s und h-rad2-20 Diplonten in dem gesamten untersuchten Dosisbereich an. Nach niedrigen UV-Dosen

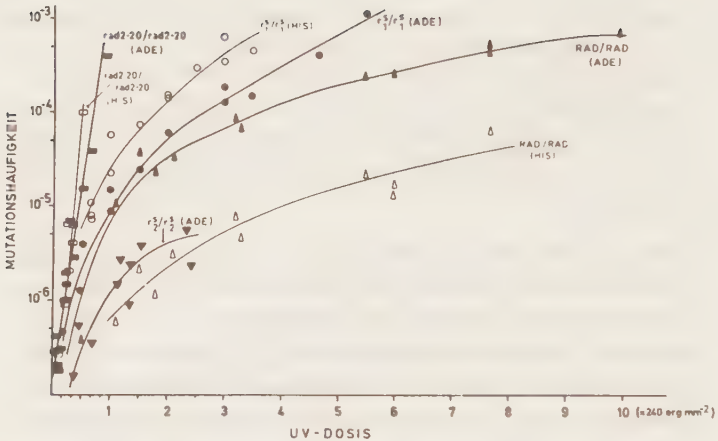


Abb. 25:

Abhängigkeit der Mutationsraten von der UV-Dosis. Für den h-RAD, h- r_2^S und h-rad2-20 Diplonten entspricht jeder Punkt einen experimentell ermittelten Wert. Bei dem h- r_1^S Diplonten stellt jeder Punkt den Mittelwert aus 3-6 unabhängigen Versuchen dar.

($< 240 \text{ erg mm}^{-2}$) liegen die Mfr des h-rad2-20 immer höher als die Mfr der anderen Stämme. Die ADE Mfr des h- r_1^S Diplonten sind größer als die des h-RAD Diplonten. Die HIS Mfr des h- r_1^S Diplonten übersteigen diejenigen des Wildtypstamms sogar um das 100-fache! Bei dem h- r_2^S Diplonten sind die ADE Mfr, ähnlich wie die Mutantenzahlen, um das 10-fache kleiner als die des h-RAD Diplonten.

Anhand der Mutationskinetik (s. auch 3.2.2.) läßt sich erkennen, in welchem Abhängigkeitsgrad die Mutationsraten von der induzierenden UV-Strahlung stehen. In Abb. 26 sind die Mfr für eine Mutationskinetik über der logarithmierten UV-Dosis aufgetragen. Für die h-RAD, h- r_1^S und h- r_2^S Diplonten lassen sich die ADE Werte durch eine Ausgleichsgerade mit einer Neigung von $n = 2$ (die Extremwerte: 1.8-2.4) darstellen. Bei dem h-rad2-20 Diplon-

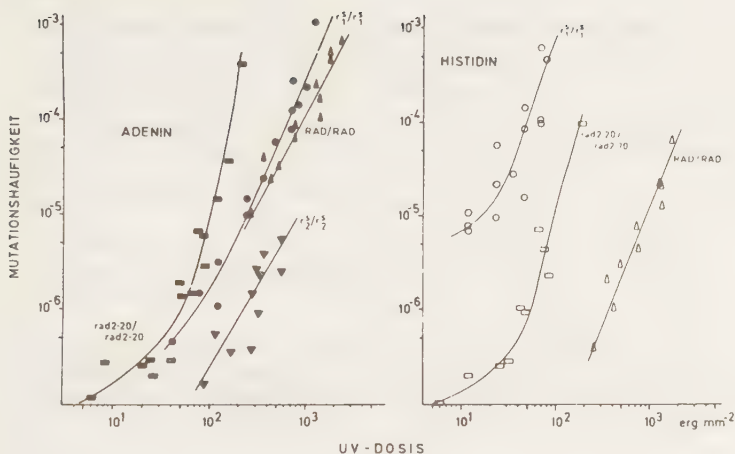


Abb. 26:

Mutationskinetik der ADE und HIS Mutationsraten für den h-RAD, h-r₁^S, h-r₂^S und h-rad2-20 Diplonten. Die Werte sind mit denen in der Abb. 25 identisch.

ten liegt eine deutliche Änderung in der ADE und der HIS Kinetik vor: zwischen 40 und 60 erg mm⁻² steigt die Neigung von $n = 1$ auf $n = 5$ an. Die Neigung der Ausgleichsgeraden für die HIS Mfr des h-RAD und des h-r₁^S Diplonten läßt sich im jeweils höheren Dosisbereich mit $n = 2$ annähern. Eine Änderung in der Kinetik, wie sie bei dem h-rad2-20 und h-r₁^S Diplonten vorliegt, muß jedoch noch abgesichert werden. Bei den h-RAD, h-r₁^S und h-r₂^S Diplonten scheinen die Mfr auf ähnlichen dosisabhängigen Prozessen zu beruhen: sie sind durch eine quadratische ($n = 2$) Abhängigkeit von der UV-Dosis charakterisiert.

Tabelle 17 stellt einen Vergleich der Mutationsraten und der Überlebensraten der 4 h-Diplonten nach Bestrahlung mit einer niedrigen UV-Dosis (200 erg mm⁻²) dar. Daraus geht hervor, daß der h-rad2-20 Diplont bei 200 erg mm⁻² eine Mfr für ADE hat, die jene des h-RAD Diplonten um das 100-fache übersteigt. Es ist jedoch zu bemerken, daß der h-rad2-20 Diplont nach dieser

Stamm	Mfr _{ADE}	Mfr _{HIS}	Überlebens- rate
h-RAD	4×10^{-6}	5×10^{-7}	8.8×10^{-1}
h-r ₁ ^s	7×10^{-6}	1.8×10^{-5}	7.5×10^{-1}
h-r ₂ ^s	7×10^{-7}	---	2.2×10^{-1}
h-rad2-20	4×10^{-4}	4×10^{-4}	8.0×10^{-4}

Tab. 17:

Vergleich der Mutationsraten und der Überlebensraten des h-RAD, h-r₁^s, h-r₂^s und h-rad2-20 Diplonten nach Bestrahlung mit einer Dosis von 200 erg mm⁻². Die Werte sind aus den Abb. 23 und 25 entnommen.

UV-Dosis gegenüber dem Wildtyp-Diplonten um das 10³-fache inaktiviert ist.

In diesem Zusammenhang ist die Abhängigkeit der Mutationsraten von den Überlebensraten aufschlußreich (Abb. 27). Eine

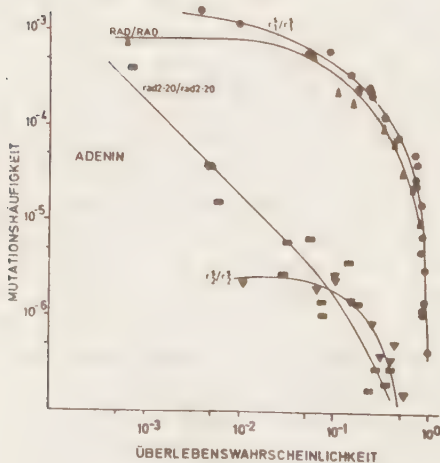


Abb. 27:

Abhängigkeit der ADE Mutationsraten von den Überlebensraten der vier h-Diplonten. Jeder Punkt entspricht einem experimentell ermittelten Wert.

Gegenüberstellung der Mfr des h-RAD mit denjenigen des h-rad2-20 Diplonten im Bereich kleiner Überlebensraten zeigt, daß sich die Werte dieser beiden Stämme annähern. Für den $h-r_1^S$ Diplonten entspricht die Relation der Reparatur präletaler und prämutativer Schäden der Relation des Wildtyp-Diplonten, während der $h-r_2^S$ Diplont im Verhältnis dazu erheblich mehr prämutative als präletale Schäden repariert.

3.4.3. Einfluß von UV + PhR auf die Mutationsraten

Aus Abb. 28 ist ersichtlich, daß eine Nachbehandlung der UV-bestrahlten Zellen mit photoreaktivierendem Licht die UV-induzierten Mutationsraten bei allen Stämmen reduziert, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. In Tabelle 17 sind die DMF Werte für $Mfr = 10^{-6}$ und die Q_{PhR} Werte bei einer UV-Dosis von 120 $erg\ mm^{-2}$ angegeben.

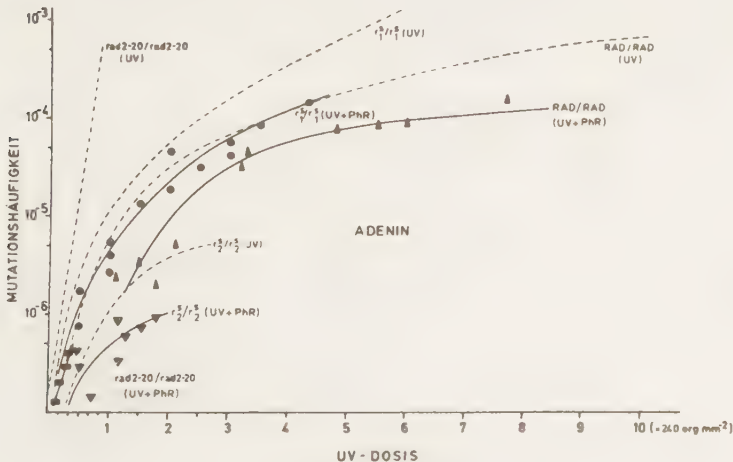


Abb. 28:

Einfluß von PhR auf die UV-induzierten ADE Mutationsraten des h-RAD, $h-r_1^S$, $h-r_2^S$ und h-rad2-20 Diplonten. Jeder Punkt entspricht einem experimentell ermittelten Wert. Die UV-induzierten Raten sind zum Vergleich gestrichelt eingezeichnet (s. Abb. 25).

Stamm	DMF _{ADE}	DMF _U	Q _{Mfr}	Q _U
h-RAD	1.75	1.5	- 6.8	---
h-r ₁ ^S	2.25	1.4	- 3.7	+ 1.13
h-r ₂ ^S	1.87	1.4	- 1.6	+ 1.21
h-rad2-20	2.42	2.5	-12.7	+61.5

Tab. 18:

Vergleich der DMF und Q_{PhR} Werte für die Mutationsraten und Überlebensraten des h-RAD, h-r₁^S, h-r₂^S und h-rad2-20 Diplonten. Die DMF Werte für ADE sind bei Mfr = 10⁻⁶ berechnet, die DMF Werte für U sind bei LD₁₀ ermittelt. Die Q_{PhR} Werte sind sowohl für die Mfr als auch für U bei einer UV-Dosis von 120 erg mm⁻² berechnet.

In Abb. 29 ist die Abhängigkeit der Mutationsraten nach PhR von den Überlebensraten nach PhR dargestellt. Bei den h-RAD, h-r₂^S und h-rad2-20 Diplonten ist die Reparatur von präletalen

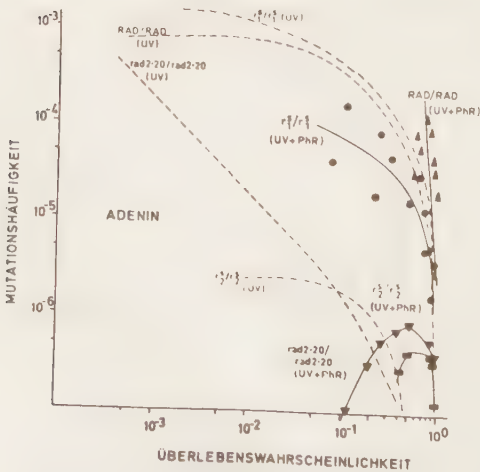


Abb. 29:

Abhängigkeit der Mfr nach PhR von den Überlebensraten nach PhR für die 4 h-Diplonten. Jeder Punkt entspricht einem experimentell ermittelten Wert.

Schäden im Verhältnis zur Reparatur von prämutativen Schäden nach PhR größer. Im Bereich von $1 \text{ bis } 5 \times 10^{-1}$ Überlebenden nach PhR bleiben also mehr prämutative Schäden in den Zellen, als nur nach UV-Bestrahlung. Anders ist es bei dem $h-r_1^S$ Diplonten, bei dem durch PhR anscheinend mehr prämutative als präletale Schäden repariert werden.

3.4.4. Einfluß von UV + LHR auf die Mutationsraten

In Abb. 30 sind die ADE Mutationsraten der 4 h-Diplonten mit und ohne LHR zusammengefaßt. LHR scheint die UV-induzierten Mutationsraten des h-RAD und h-rad2-20 Diplonten nicht zu beeinflussen, während bei dem $h-r_1^S$ Diplonten eine teilweise geringfügige Erhöhung der Mutationsraten durch LHR hervorgerufen wird. Diese liegt vermutlich jedoch noch innerhalb der Fehlergrenze. Bei dem $h-r_2^S$ Diplonten scheint LHR eine Reduktion der UV-induzierten Mutationsraten zu bewirken. Möglicherweise liegt aber auch sie noch innerhalb der Fehlergrenze.

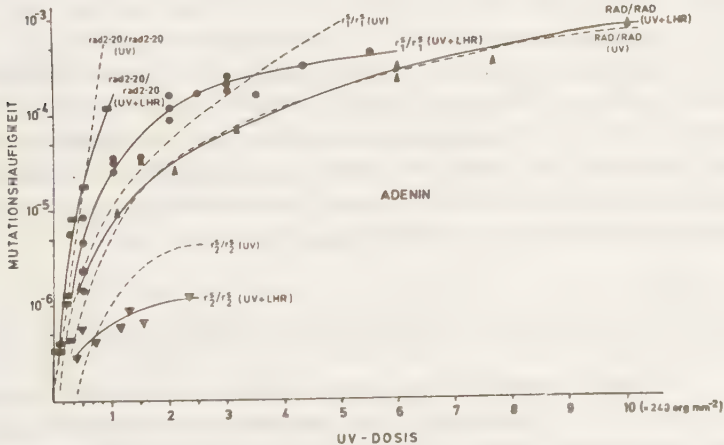


Abb. 30:

Einfluß von LHR auf die UV-induzierten ADE Mutationsraten des h-RAD, $h-r_1^S$, $h-r_2^S$ und h-rad2-20 Diplonten. Jeder Punkt entspricht einem experimentell ermittelten Wert. (Die UV-induzierten Werte sind zum Vergleich gestrichelt eingezeichnet.)

Stamm	DMF _{ADE}	DMF _U	Q _{Mfr}	Q _U
h-RAD	0.6 ^a	1.2	+10 ^a	+ 1
h-r ₁ ^S	1.33	1.2	+ 1.68	+ 1
h-r ₂ ^S	1.87	1.3	+ 1.1	+ 1.12
h-rad2-20	0.79	1.3	+ 1.4	+ 4.6

Tab. 19:

Vergleich der DMF und Q_{LHR} Werte für die Mutations- und Überlebensraten des h-RAD, h-r₁^S, h-r₂^S und h-rad2-20 Diplonten. Die DMF Werte für ADE sind bei Mfr = 10⁻⁶ berechnet, die DMF Werte für U sind bei LD₁₀ ermittelt worden. Die Q_{LHR} Werte sind sowohl für die Mfr als auch für U bei einer UV-Dosis von 120 erg mm⁻² berechnet.

a) Diese Werte sind extrapoliert worden.

Aus Tabelle 19 geht hervor, daß eine enge Korrelation zwischen den DMF bzw. den Q_{LHR} Werten für die Mutations- und Überlebensraten nicht besteht. Werden die Mutationsraten bei Mfr = 10⁻⁶ verglichen, scheint LHR bei dem h-RAD und h-rad2-20 Diplonten eine Reduktion der UV-induzierten Mutationsrate zu bewirken. LHR scheint jedoch bei allen Stämmen nach 120 erg mm⁻² erhöhend auf die UV-induzierten Mutationsraten zu wirken. Weitere Versuche sind nötig, um festzustellen, ob LHR in Abhängigkeit von der applizierten UV-Dosis die UV-induzierten Mutationsraten erst erhöhend und dann reduzierend beeinflusst.

3.4.5. Einfluß von UV + PhR + LHR auf die Mutationsraten

In Abb. 31 sind die ADE Mutationsraten der 4 h-rad Diplonten mit und ohne doppelter Nachbehandlung in Abhängigkeit von der applizierten UV-Dosis dargestellt. Bei dem h-RAD und dem h-r₁^S Diplonten läßt sich ein Einfluß von PhR+LHR auf die UV-induzierten Mutationsraten erst nach UV-Dosen > 840 erg mm⁻² feststellen. Bei diesen höheren Dosen ist der reduzierende Ef-

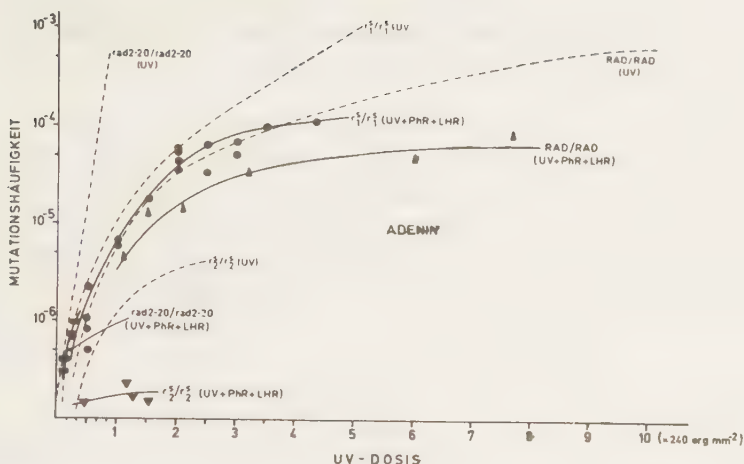


Abb. 31:

Einfluß von PhR+LHR auf die UV-induzierten ADE Mutationsraten des h-RAD, h-r₁^s, h-r₂^s und h-rad2-20 Diplonten. Jeder Punkt entspricht einem experimentell ermittelten Wert. (Die UV-induzierten Werte sind zum Vergleich gestrichelt eingezeichnet.)

fekt größer als nur PhR (für den h-RAD Diplonten) bzw. PhR und LHR (für den h-r₁^s Diplonten). Bei dem h-rad2-20 Diplonten ist nach UV-Dosen $> 40 \text{ erg mm}^{-2}$ eine starke Reduktion der Mutationsraten zu erkennen, während die UV-induzierten ADE Mutationsraten bei dem h-r₂^s Diplonten nach PhR+LHR auf ein Niveau reduziert werden, das den spontanen Mutationsraten entspricht!

Ein Vergleich der Überlebensabhängigkeit der ADE Mutationsraten nach PhR+LHR ist in Abb. 32 dargestellt. Bei dem h-RAD Diplonten verschiebt sich die Relation, in der präletale zu prämutativen Schäden nach UV repariert werden, nach PhR+LHR zugunsten der präletalen Schäden. Auch bei dem h-rad2-20 Diplonten werden nach PhR+LHR vergleichsweise mehr präletale als prämutative Schäden repariert. Bei dem h-r₂^s Diplonten werden nach PhR+LHR jedoch mehr prämutative Schäden repariert im Vergleich zu den präletalen als nur nach UV-Bestrahlung. Bei dem h-r₁^s Di-

plonten scheint die Relation zwischen der Reparatur von prä-
letalen und prämutativen Schäden nach PhR+LHR mit derjenigen
nur nach UV-Bestrahlung übereinzustimmen.

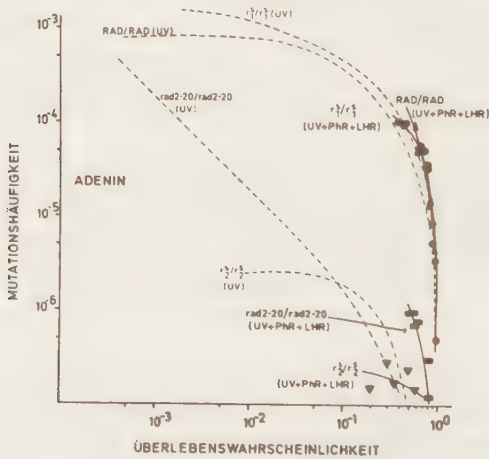


Abb. 32:

Abhängigkeit der Mutationsraten nach PhR+LHR von
den Überlebensraten nach PhR+LHR der h-RAD, h- r_1 , h- r_2 und
h-rad2-20 Diplonten. Jeder Punkt entspricht einem experi-
mentell ermittelten Wert.

3.5. Spontane Mutationsraten

3.5.1. Methodisches

Die spontanen Mutationshäufigkeiten der 4 h-rad Diplonten sind mit Hilfe des Fluktuationstests (s. 2.5.2.) ermittelt worden. Berechnungen und Erwägungen zu diesem Verfahren sind bereits unter 3.3.1. aufgeführt, da der Fluktuationstest auch für die Bestimmung der spontanen mitotischen inter- und intra-genischen Rekombinationsraten angewendet wurde.

3.5.2. Die spontanen Mutationsraten

In Tabelle 20 sind die spontanen Reversionsraten der h-rad Diplonten zum ADE und HIS Phänotyp dargestellt.

Auch in diesen Versuchen wurden die Vorzuchten nicht selektioniert (s. 3.4.2.1.). Bei dem $h-r_1^S$ Diplonten konnten dadurch keine Reversionsraten für HIS ermittelt werden: der Aufwuchs war zu dicht. Auffällig sind die sehr niedrigen Raten des $h-r_2^S$ Diplonten, sowie die relativ hohen Raten des h-rad2-20 Diplonten. Da die Einzelwerte stark um die dargestellten Mittelwerte streuen, sind die Unterschiede der Mittelwerte nicht signifikant. Diese Ergebnisse müssen jedoch durch weitere Versuche abgesichert und bestätigt werden. Eine Korrelation zwischen den spontanen Rekombinationsraten und den spontanen Mutationsraten scheint nicht zu bestehen.

	h-RAD	$h-r_1^S$	$h-r_2^S$	h-rad2-20
ADE	6.7×10^{-8}	5.9×10^{-8}	6.9×10^{-9}	1.5×10^{-7}
HIS	3.6×10^{-8}	---	1.7×10^{-9}	9.2×10^{-8}

Tab. 20:

Spontane Mutationsraten des h-RAD, $h-r_1^S$, $h-r_2^S$ und h-rad2-20 Diplonten. Die Raten sind Mittelwerte aus 5-7 unabhängigen Versuchen.

4. DISKUSSION

4.1. Einleitung

Die dargestellten Ergebnisse sind ein Versuch, mit strahlenbiologischen Methoden der Frage nach einem Zusammenhang zwischen UV-induzierten mitotischen Rekombinationsereignissen einerseits und Reparaturprozessen andererseits nachzugehen. Hierzu wurde das Auftreten von mitotischen Rekombinanten in Abhängigkeit von der UV-Dosis, von verschiedenen Nachbehandlungen und von der Überlebenswahrscheinlichkeit eines Stammes untersucht. Ferner wurden diese Abhängigkeiten bei unterschiedlich UV-sensiblen Diplonten bestimmt.

Formell lassen sich diese Einflüsse auf die mitotische Rekombination u.a. in zwei Gruppen gliedern:

- äußere Einflüsse auf die Zelle: z.B. UV-Dosis, PhR, LHR
- durch den Genotyp der Zelle bedingte Einflüsse: z.B. Strahlensensibilität, physiologischer Zustand der Zelle

Um die Ergebnisse möglichst übersichtlich darzustellen, ist parallel geschildert worden, welchen Einfluß UV-Bestrahlung, PhR und LHR auf die Überlebenswahrscheinlichkeit, mitotische Rekombination und Mutation der einzelnen Stämme haben. Nun soll die Frage nach dem Zusammenhang zwischen mitotischer Rekombination und Reparatur nach UV-Bestrahlung diskutiert werden, wobei es sinnvoll ist, die Ergebnisse in Abhängigkeit von dem Einfluß der unterschiedlichen rad Mutationen zu erörtern. Hierfür müssen folgende Voraussetzungen beachtet und bedacht werden:

- die Isogenität der Stämme
- die Art und Verteilung der UV-induzierten Schäden
- die Gleichwertigkeit der Schäden
- die Möglichkeit, Art und Zeitpunkt des untersuchten Reparaturmechanismus zu charakterisieren.

Im Folgenden soll zunächst auf diese Voraussetzungen eingegangen werden.

4.1.1. Isogenität der Stämme

Für diese Arbeit wurde ein Stammsystem von weitgehend isogenen Stämmen der genetisch gut charakterisierten Hefe *Saccharomyces cerevisiae* aufgebaut (KOWALSKI 1971, 2.1). Demzufolge sollte die genetische Feinstruktur zumindest der verwendeten Marker identisch sein und alle verwendeten Stämme annähernd gleiche stoffwechselphysiologischen Eigenschaften aufweisen. Nur so läßt sich ein unterschiedlicher Einfluß von UV-induzierten Schäden auf die Überlebenden, Rekombinanten und/oder Mutanten bei den verschiedenen Stämmen eindeutig auf unterschiedliche rad Mutationen zurückführen.

Unterschiede zwischen den Stämmen, wie z.B. in der Atmungsfähigkeit, erschweren eindeutige Aussagen über den Einfluß von rad Mutationen. Für den RAD, r_1^S und rad2-20 Diplonten können im Rahmen der durchgeführten Versuche ähnliche stoffwechselphysiologische Eigenschaften angenommen werden. Somit läßt sich das Verhalten dieser Stämme nach UV-Bestrahlung mit aller Wahrscheinlichkeit auf die unterschiedlichen rad Mutationen zurückführen. Dasselbe gilt für die h-RAD, $h-r_1^S$, $h-r_2^S$ und h-rad2-20 Diplonten. Bei dem r_2^S Diplonten jedoch erfordern die geringe Atmungsfähigkeit, die relative Instabilität und starke Klumpung (vgl. auch 2.1.) eine kritische Betrachtung der Ergebnisse, die mit diesem Stamm erzielt wurden.

4.1.2. Art und Verteilung der UV-induzierten Schäden

Nach UV-Bestrahlung treten hauptsächlich Pyrimidindimere ($\hat{P}\hat{P}$) in der DNS auf, aber auch Dihydro- und Hydratationsprodukte, Addukte, Verbindungen zwischen DNS und Proteinen (DNA-protein-crosslinks), Verbindungen zwischen DNS-Strängen (DNA-DNA-crosslinks), sowie Strangbrüche (Zusammenfassende Arbeiten: SMITH 1966, FAHR 1969, SMITH und HANAWALT 1969, VARGHESE 1972, RADMAN et al. 1973). Isoliert wurden diese Schäden hauptsächlich aus in vitro bestrahlter DNS. Es ist wahrscheinlich, daß die Schadensarten nach Bestrahlungen in vivo in ähnlichen Proportionen auftreten wie bei in vitro Versuchen (nämlich mit einer überwiegenden Menge an $\hat{P}\hat{P}$),

aber es konnte noch nicht bewiesen werden. Auch muß noch geklärt werden, ob z.B. bei Hefen, deren DNS eng mit Histonen und Proteinen verbunden ist, DNA-protein-crosslinks als UV-induzierte Schäden eine größere Rolle spielen als bei *E. coli* oder Bakteriophagen (vgl. HAYNES 1964).

Die räumliche Verteilung von Schäden in der DNS ist für ihre biologische Wirkung (und Reparierbarkeit) von Bedeutung. Nach der Target-Theorie muß eine statistische Verteilung der Schäden vorausgesetzt werden. Untersuchungen von BRUNK 1973, GUÉRON und SHULMAN 1968, sowie von VOLOGODSKII et al. 1974 zeigten jedoch, daß die P $\bar{P}$ -Bildung beispielsweise nicht überall in der DNS mit gleicher Wahrscheinlichkeit stattfindet. Anhäufungen von Pyrimidinen (= pyrimidine tracts) begünstigen eine vermehrte P $\bar{P}$ -Bildung. Ballungen von P $\bar{P}$ (= pyrimidine dimer clusters) können durch die starke Verdrillung des DNS-Rückgrats und Elektronentransfer Einzel- und Doppelstrangbrüche an anderer Stelle verursachen (VOLOGODSKII et al. 1974).

Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm wird nicht nur von Nukleinsäuren, sondern auch von Proteinen absorbiert. Ein möglicher Einfluß von UV auf die Proteine darf daher doch nicht vernachlässigt werden (SMITH und HANAWALT 1969). Obwohl diese Schäden schwer zu charakterisieren und zu isolieren sind ("unspezifische" Schäden), ist es durchaus denkbar, daß sie z.B. in Regulationssystemen spezifische Störungen und Änderungen bewirken können. In diesem Zusammenhang darf auch die schädigende Wirkung von UV-Strahlen auf t-RNS und m-RNS Moleküle, sowie auf die Ribosomen nicht unerwähnt bleiben.

4.1.3. Reparaturfähigkeit der Zellen und Reparierbarkeit der Schäden

Bei Hefen gilt das Koloniebildungsvermögen nach einer UV-Bestrahlung als Hinweis für stattgefundene Reparatur. Dies bedeutet, daß nicht nur die bestrahlte Zelle selbst, sondern auch zumindest ein Teil ihrer Nachkommen teilungsfähig sein muß. Reparatur, die nur zu einer sehr begrenzten Teilungsfähigkeit ohne

sichtbare Koloniebildung führt, kann mit dieser Methode nicht erfaßt werden. Eine Alternative zu dieser Methode stellt die Bestimmung von Enzymaktivitäten dar, die es gestattet, Rekombinanten in vitro und ohne Koloniebildung zu erfassen (HOLLIDAY 1971). Leider war es nicht möglich, diese "biochemische" Methode für die in dieser Arbeit verwendeten Stämme anzuwenden.

Der Gebrauch des Koloniebildungsvermögens als "Reparatur-index" ist besonders für Untersuchungen an der Dunkelreparatur problematisch. Mit dieser Methode ist z.B. eine eindeutige Differenzierung zwischen Reparatur während der Pufferhaltung bei LHR und Reparatur auf dem Nährmedium noch vor der ersten Zellteilung nicht möglich. EXR im engeren Sinne (HANAWALT und HAYNES 1967) dürfte nur während der Pufferhaltung und vor der ersten DNS-Replikation nach UV-Bestrahlung stattfinden. Die REC Reparatur wird hingegen als Prozeß definiert, der eine nach der UV-Bestrahlung abgelaufene DNS-Replikation voraussetzt (HOWARD-FLANDERS 1968) und findet daher möglicherweise nicht während der Pufferhaltung, sondern auf dem Nährmedium nach der ersten DNS-Replikation --aber vor der ersten Zellteilung-- statt. REC Reparatur ist besonders gut an Bakterien erforscht und aus diesem System heraus definiert worden. Bei Bakterien (wie bei allen haploiden Zellen) ist eine Rekombination erst nach einer DNS-Replikation möglich. Diploide Zellen können jedoch auch ohne eine Replikationsrunde rekombinieren, da sie einen doppelten Chromosomensatz enthalten. Für eine Definition der REC Reparatur ist dieser Unterschied zwischen Haplonten und Diplonten bedeutsam. Gerade bei Diplonten ist noch nicht geklärt, ob

- REC Reparatur und mitotische Rekombination mit demselben Satz an Enzymen in derselben Weise arbeiten, oder ob
- REC Reparatur vor allem in Haplonten wirksam ist, während diese Funktion in Diplonten von den mitotischen Rekombinationsenzymen übernommen wird, ohne daß eine Replikation vorausgehen muß.

Modellvorstellungen, die aus Versuchen mit Bakterien entstanden sind, dürfen nur mit größter Vorsicht auf eukaryotische Systeme übertragen werden.

UV-induzierte Schäden behindern sowohl die DNS-Replikation als auch die Transkription (POLLARD und BARONE 1966, LASKOWSKI et al. 1968). Theoretisch müßten diese physiko-chemischen Änderungen der DNS als "Störungen" qualitativ gleichwertig für die Zellen sein. Alle $\hat{P}\hat{P}$ sollten unabhängig von ihrer Lokalisierung in der DNS auf das Zellgeschehen in gleicher Weise störend wirken, von den Reparaturmechanismen als gleichwertige Schäden erkannt und repariert werden. Jedoch sind $\hat{P}\hat{P}$ clusters, wie auch andere dicht beieinander auftretende Schäden, den Reparatur-enzymen wahrscheinlich schwerer zugänglich als relativ einzeln vorkommende Schäden. Auch die benachbarten Basen eines UV-induzierten Schadens sind anscheinend qualitativ (SHERMAN et al. 1969) und quantitativ (z.B. PhR-Enzym: SETLOW und BOLLUM 1968) für die Durchführung einer Reparatur von Bedeutung.

Zusätzlich tritt die Frage auf, ob präletale, prämutative und prärekombinogene Schäden für ein Reparatursystem gleichwertig sind und in gleicher Häufigkeit repariert werden. Die Tatsache, daß UV-induzierte Schäden einer Art ($\hat{P}\hat{P}$, crosslinks usw.) überall in der DNS auftreten können, erlaubt zunächst die Annahme einer undifferenzierten Reparatur. Es ist jedoch auch denkbar, daß Schäden in bestimmten kritischen Funktionen (Regulation des Energiehaushalts oder der Proteinbiosynthese) von der Zelle bevorzugt repariert werden.

4.1.4. Rekombination und REC Reparatur

Werden UV-induzierte Rekombinationsereignisse im Bereich der untersuchten Marker als Hinweise für UV-Schäden gewertet, muß beachtet werden, daß nur ein Teil der theoretisch möglichen Rekombinanten erfaßt werden kann. Dies ist bedingt durch

- den Phänotyp der Rekombinanten (vgl. 1.2, 2.1 und Anhang I)
- die Ermittlung der Rekombinanten unter den überlebenden Klonen.

Es muß angenommen werden, daß die UV-induzierte Rekombinationsrate unter den "toten" Zellen genauso hoch ist wie unter den ü-

berlebenden Zellen. Diese Annahme wurde durch die biochemische Ermittlung der Rekombinationsereignisse an *Ustilago* bestätigt (HOLLIDAY 1971).

UV-induzierte und spontane Rekombinanten haben den gleichen Phänotyp. Es ist allerdings noch ungewiss, ob induzierte und spontane Rekombinanten durch denselben Prozeß entstehen. Vorläufig muß angenommen werden, daß der Rekombinationsprozeß (s. 1.2) in bestrahlten und unbestrahlten Zellen annähernd gleich ist. Das Modell der REC Reparatur (1.1 und HOWARD-FLANDERS 1968) und der Rekombination (1.2. und MESELSON und RADDING 1975) weisen Ähnlichkeiten in den geforderten Enzymfunktionen auf: Exonuklease-, Polymerase- und Ligasefunktionen. Noch ist nicht geklärt, ob ein direkter Zusammenhang zwischen den beiden Mechanismen besteht. Die Eigenschaften der rec^- Mutanten von *E. coli* (Zusammenfassung bei CLARK 1973), bei denen sowohl die Rekombination als auch REC Reparatur durch Mutation in einem Gen gestört sein kann, weisen auf einen engen Zusammenhang beider Mechanismen. Noch ist unklar, ob

- ausgedehnte Reparatur ein Bestandteil des Rekombinationsmechanismus ist, oder *cb*
- der Rekombinationsmechanismus auch in das REC System eingliedert ist.

Als Diskussionsgrundlage wird in dieser Arbeit zunächst angenommen, daß bei Hefen ein ähnlicher Prozeß wie REC Reparatur bei *E. coli* stattfindet. Ferner wird postuliert, daß außerdem ein mitotischer Rekombinationsprozeß ohne unmittelbar vorausgegangene DNS-Replikation nach UV-Bestrahlung an der Entstehung von Rekombinanten beteiligt sein kann.

4.1.5. Zusammenhang von Reparaturprozessen mit der UV-Induktion von Mutanten

Für die UV-induzierte Mutation treffen die Überlegungen aus 4.1.1. bis 4.1.3. ebenfalls zu. Darüber hinaus erscheint es sinnvoll, einige Modelle zu erwähnen, die einen Zusammenhang

zwischen verschiedenen Reparatursystemen und der Mutationsinduktion aufzeigen.

- Das EXR System ist nach heutigen Vorstellungen nicht an der Induktion von Mutationsereignissen beteiligt, da es weitestgehend fehlerfrei arbeiten soll (WITKIN 1967, BRIDGES 1969, WITKIN und GEORGE 1973). Dies gilt nicht nur für *E. coli*, sondern auch für *Saccharomyces* (RESNICK 1968, LEMONTT 1971a-c).
- Das REC System bei Bakterien wird als fehlerhaft arbeitende Reparatur charakterisiert, da rec^- Mutanten nicht nur reduzierte Rekombinationshäufigkeiten, sondern auch reduzierte Mutationshäufigkeiten aufweisen (STORM 1971, CLARK 1973). Bei Hefen ist das REC System noch nicht so gut charakterisiert wie bei Bakterien. Dennoch gibt es Hinweise dafür, daß es bei Hefen in manchen Eigenschaften dem der Bakterien entspricht (LEMONTT 1971 a-c, LAWRENCE et al. 1974).
- Es gibt experimentelle Hinweise für zwei unterschiedliche postreplikative Reparatursysteme bei Bakterien: einen Rekombinationsmechanismus und einen "gap filling" Mechanismus. Für beide Vorgänge ist das REC A Genprodukt notwendig. (SMITH 1971, RADMAN et al. 1973). Die postreplikative Rekombination soll fehlerfrei, der "gap filling" Prozeß hingegen fehlerhaft arbeiten (BRIDGES et al. 1967, WITKIN 1967, 1969, RADMAN et al. 1973).

Die Modellvorstellungen über die UV-induzierte Mutagenese sind, wie für das REC Modell, hauptsächlich aus Versuchsergebnissen an Bakterien entwickelt worden. Eine direkte Übertragung dieser Vorstellungen auf ein diploides eukaryotisches System ist daher nicht ohne weiteres möglich. FOGEL und MORTIMER (1970) konnten mit selektiven Versuchs- und Kreuzungsbedingungen beweisen, daß der Rekombinationsprozeß in unbestrahlten Zellen außerordentlich exakt abläuft. Möglicherweise entspricht dieser an diploiden *Saccharomyces*-Zellen untersuchte exakte Rekombinationsvorgang der postreplikativen Rekombination bei Bakterien.

4.2. Einfluß der rad Gene auf die Reparatur von präletalen Schäden

Die RAD, r_1^S , r_2^S und rad2-20 Diplonten sind unterschiedlich UV-sensibel (Abb. 5). Das Verhalten der Diplonten ist dabei z.T. anders als das der Haplonten (Tab. 3). Die r_1^S und r_2^S Haplonten sind annähernd gleich sensibel, jedoch zeigt der r_1^S Diplont gegenüber dem r_1^S Haplonten einen deutlichen Resistenzgewinn. Dies trifft nicht für den r_2^S Diplonten zu, der gegenüber dem entsprechenden RAD Stamm genauso sensibel ist wie der r_2^S Haplont. Der rad2-20 Diplont zeigt nicht nur einen Resistenzgewinn gegenüber dem rad2-20 Haplonten, sondern bildet eine deutliche, wenn auch kleine Schulter. Der Resistenzgewinn der RAD, r_1^S und rad2-20 Diplonten scheint auf eine Reparatur hinzuweisen, die durch den diploiden Zustand begünstigt wird (z.B. REC Reparatur oder auch der α -Effekt (LASKOWSKI 1960)). Bei dem r_2^S Diplonten fehlt offenbar diese für Diplonten spezifische Reparaturkapazität --oder sie ist nur in stark reduziertem Maße in ihm vorhanden.

Ein Teil der präletalen Schäden ist bei allen Diplonten photoreaktivierbar (Abb. 6). Das Ausmaß der Photoreaktivierbarkeit nach gleicher UV-Dosis ist jedoch in den einzelnen Stämmen unterschiedlich groß. Hieraus darf nicht auf eine unterschiedliche Menge an $\hat{P}P$ bei den einzelnen Stämmen geschlossen werden, obwohl PhR spezifisch $\hat{P}P$ repariert. Nach Bestrahlung mit einer identischen UV-Dosis müßte die gleiche Menge derselben Schäden in isogenen Stämmen verursacht werden. Bei dem RAD Diplonten sind die $\hat{P}P$ nach relativ niedrigen UV-Dosen noch immer nahezu vollständig photoreaktivierbar. Bei den rad Stämmen (r_1^S , r_2^S und rad2-20) müßten demnach die PP nach identischen UV-Dosen wie beim Wildtyp RAD Stamm ebenfalls nahezu vollständig photoreaktivierbar sein. Dies ist jedoch nicht der Fall. Somit ergibt sich die Frage, welche gleichzeitig ablaufenden Prozesse das Ausmaß der Photoreaktivierung einschränken können. Als "Störprozesse" kommen vor allem Reparaturvorgänge in Betracht.

Ein Reparaturprozess, der dem PhR-Enzym Substrat entziehen

kann, ist EXR. Bereits während der UV-Bestrahlung, aber dann vor allem während der PhR-Behandlung, finden mit aller Wahrscheinlichkeit Dunkelreparaturprozesse statt (YASUI, persönliche Mitteilung). Bei Stämmen mit einem defekten EXR System (z.B. unvollständig arbeitenden Endo- und Exonukleasen) ist es denkbar, daß den PhR-Enzymen Substrat entzogen wird, ohne daß die Schäden selbst völlig repariert werden. Möglicherweise ist dies bei dem rad2-20 Diplonten der Fall.

Nach höheren UV-Dosen erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, mit der die Schäden gehäuft auftreten (z.B. $\hat{P}P$ clusters). Möglicherweise behindern solche Anhäufungen von Schäden indirekt die PhR-Enzyme, wenn die Zahl der angrenzenden unbeschädigten Basen nicht ausreicht, um einen Enzym-Substrat-Komplex zu bilden (vgl. SETLOW und BOLLUM 1968). Ein unterschiedliches Ausmaß an PhR bei den einzelnen Stämmen kann jedoch weder durch $\hat{P}P$ clusters, noch mit physiologischen Änderungen in den Zellen nach UV-Bestrahlung erklärt werden, da die Schadenssetzung bei isogenen Stämmen nach gleicher UV-Dosis annähernd identisch ist.

Eine Pufferhaltung im Dunkeln nach UV-Bestrahlung schließt die spezifische Wirkung von PhR aus. Nur EXR und REC Reparatur sind z.Z. als einzige Reparaturmechanismen genauer charakterisiert, obwohl noch andere Reparaturprozesse während der Dunkelhaltung ablaufen (z.B. RAD 50-51-pathway, HAYNES 1975).

Auch die Dunkelreparatur findet bei dem RAD, r_1^S , r_2^S und rad2-20 Diplonten in unterschiedlichem Ausmaß statt (Abb. 7). Es ist bemerkenswert, besonders bei dem Wildtyp RAD Diplonten, daß die Fähigkeit zur Dunkelreparatur in allen Stämmen erheblich geringer ist als die Fähigkeit zur Photoreparatur. Möglicherweise ist diese Tatsache auf suboptimale Pufferhaltungsbedingungen zurückzuführen. Methodische Schwierigkeiten und mögliche Fehlerquellen bei der Pufferhaltung sind in 3.1.1. und 3.1.4. bereits ausführlich behandelt worden.

Aus den DMF_{LHR} Werten (Tab. 6) geht hervor, daß LHR kaum

eine Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit bewirkt. Die Q_{LHR} Werte in Tab. 7 spiegeln den Kurvenverlauf (Abb. 7) wider, denn sie zeigen eine zunehmende Dunkelreparatur mit steigender UV-Dosis, wenn die Werte $U(D_x + LHR)$ und $U(D_x)$ verglichen werden.

Ein positives LHR-Vermögen des rad2-20 Diplonten läßt sich nicht absichern. Für ein gutes LHR-Vermögen ist ein intaktes EXR System von entscheidender Bedeutung (GANESAN und SMITH 1968 und 1969). Bei dem rad2-20 Diplonten ist jedoch gerade dieses Reparatursystem defekt (UNRAU et al. 1971, RESNICK und SETLOW 1972), sodaß eine deutliche Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit bei diesem Stamm nach LHR nicht erwartet werden kann.

Trotz der suboptimalen Pufferhaltungsbedingungen erscheint es berechtigt, bei dem RAD, r_1^S und dem r_2^S Diplonten auf eine Fähigkeit zur Dunkelreparatur --zumindest für Bereiche höherer Inaktivierung-- zu schliessen. Ob es sich hierbei um EXR, REC Reparatur, den RAD-50-51-pathway und/oder anderer Mechanismen handelt, läßt sich aus den vorhandenen Ergebnissen nicht feststellen.

Die Nachbehandlung der UV-bestrahlten Stämme erst mit photo-reaktivierendem Licht und anschließend mit LHR, sollte zunächst eine möglichst vollständige Reparatur von $\hat{P}\hat{P}$ durch PhR bewirken, damit hauptsächlich andere UV-Schäden während LHR repariert werden. Wäre die spezifische Wirkung von PhR in allen Stämmen quantitativ, könnte LHR nach PhR als Maß für den Anteil anderer Schäden gewertet werden.

Die Photoreparatur verläuft jedoch in allen Stämmen nicht quantitativ (Abb. 6). Den Dunkelreparaturprozessen bleiben somit neben anderen UV-Schäden die nicht-photoreaktivierten $\hat{P}\hat{P}$ als Substrat. Kapazitäten einzelner Reparatursysteme wie PhR, EXR und REC lassen sich gegeneinander weder quantitativ noch qualitativ abgrenzen. In Versuchen mit E. coli wurde festgestellt, daß Reparaturprozesse während LHR durch vorherige PhR begünstigt werden (PhR-stimulated gap filling, BRIDGES und SEDGEWICK 1974).

Ein ähnlicher Vorgang ist für Hefen auch denkbar. Obwohl bei der Dunkelreparatur noch viele Fragen offen sind, ermöglicht ein Vergleich der doppelten Nachbehandlungen (PhR+LHR) mit den jeweiligen Einzelbehandlungen (PhR bzw. LHR) dennoch Aussagen über die Fähigkeit eines Stammes zur Dunkelreparatur.

Bei einem Stamm mit guter Dunkelreparatur müßten die Überlebenschancen nach UV+PhR+LHR größer sein als nach UV+PhR. Ist ein Stamm aber nicht zur Dunkelreparatur fähig, sollten sich die Überlebenschancen nach UV+PhR+LHR mit denen nach UV+PhR decken.

Für den RAD Diplonten trifft die erste Möglichkeit zu, und erstaunlicherweise offenbar auch für den rad2-20 Diplonten (Abb. 9, Tab. 10). Diese Stämme sind anscheinend in der Lage, nicht nur FP, sondern auch andere Schäden zu reparieren. Bei einem Wildtyp-Stamm wird diese Eigenschaft --der Besitz und die Funktionsfähigkeit aller Reparatursysteme-- ohnehin vorausgesetzt, bei dem im EXR System defekten rad2-20 Diplonten ist diese fast additive Wirkung der beiden Nachbehandlungen auf die Überlebenswahrscheinlichkeit nicht selbstverständlich. Möglicherweise werden bei dem rad2-20 Diplonten einige $\hat{P}P$ während der Photoreaktivierung durch defekte EXR-Enzyme (z.B. Endonukleasen) "maskiert". Dissoziieren diese Enzym-Substrat-Komplexe während LHR, sind die $\hat{P}P$ einem anderen Reparatursystem wie REC, dem RAD50-51 pathway oder dem PhR-stimulated-gap-filling wieder als Substrat zugänglich.

Bei dem r_1^S Diplonten bewirkt eine doppelte Nachbehandlung keine signifikante Erhöhung der Überlebensraten über diejenige nach PhR hinaus (Tab. 10, Abb. 6 u. 9). Offenbar ist dieser Stamm nicht in demselben Maße zur Dunkelreparatur fähig wie der RAD oder der rad2-20 Diplont. Möglicherweise ist der r_1^S Diplont nicht in der Lage, andere Schäden als $\hat{P}P$ zu reparieren. Es ist aber auch denkbar, daß bei diesem Stamm das EXR System defekt ist, und zwar in der Polymerase- oder der Ligase-Funktion. In diesem Fall würden die $\hat{P}P$ erkannt und ausgeschnitten werden, aber gaps in der DNS übrig bleiben. Es ist unwahrscheinlich, daß diese gaps von einem PhR-stimulated-gap-filling-process (BRIDGES und

SEDGEWICK 1974) repariert werden, da sonst der Anstieg der Überlebenswahrscheinlichkeit größer sein müßte. Anscheinend werden diese gaps (und auch andere Schäden) von anderen Reparaturmechanismen repariert, die möglicherweise erst in nährstoffhaltigem Milieu ablaufen können oder dort den Vorgang vollenden. Während einer Pufferhaltung sind solche Mechanismen offenbar nicht funktionsfähig.

Erstaunlich ist das Verhalten des r_2^s Diplonten nach UV+PhR+LHR, denn nach der Doppelbehandlung ist die Überlebenswahrscheinlichkeit bei diesem Stamm geringer als nach den jeweiligen Einzelbehandlungen (Tab. 10). Die hohe Atmungsdefizienz nach LHR kann dieses Phänomen nicht erklären; der $h-r_2^s$ Diplont zeigte als atmungskompetenter Stamm daselbe Verhalten. Es ist schwer vorstellbar, daß die diversen Reparaturprozesse sich gegenseitig behindern wenn vor der Pufferhaltung photo-reaktiviert wurde.

4.3. Einfluß der rad Gene auf UV-induzierte Rekombination

4.3.1. Intergenische Rekombinanten

Bei der UV-Induktion von mitotischen intergenischen Rekombinationsereignissen unterscheiden sich die RAD, r_1^S , r_2^S und rad2-20 Diplonten (Abb. 10):

- r_2^S induziert keinerlei Rekombinanten nach UV-Bestrahlung
- Bei dem rad2-20 Diplonten ist bereits nach sehr niedrigen UV-Dosen die Induktion von Rekombinanten 60-mal größer als bei dem RAD Diplonten.
- r_1^S induziert 30-mal mehr intergenische Rekombinanten als der RAD Diplont.

Erstaunlich ist die Ähnlichkeit zwischen dem RAD und dem rad2-20 Diplonten bezüglich der Induktion von intergenischen Rekombinanten, obwohl sich diese beiden Stämme in ihrer UV-Sensibilität stark unterscheiden. Besonders eindrucksvoll ist die nahezu identische Abhängigkeit der intergenischen Rekombinationshäufigkeiten (Rfr) bzw. der intergenischen Rekombinanten (RZ) von den Überlebensraten des jeweiligen Stammes (Abb. 13 und 14). In Abb. 13 fallen die Abhängigkeiten im Bereich von 10^0 bis 5×10^{-3} Überlebende zusammen; d.h., sie sind für beide Stämme in diesem Bereich identisch. In Abb. 14 zeigen beide Diplonten die größte Induktion zwischen 8 und 9×10^{-1} Überlebende. Dies entspricht bei dem rad2-20 Diplonten einer UV-Dosis von $13-23 \text{ erg mm}^{-2}$, bei dem RAD Diplonten hingegen einer UV-Dosis von $336-576 \text{ erg mm}^{-2}$. Aufgrund dieser Parallelen zwischen der Überlebensabhängigkeit der UV-Induktion von intergenischen Rekombinationsereignissen können für den RAD und den rad2-20 Diplonten ähnliche dosisabhängige Prozesse angenommen werden, die Rekombinanten produzieren. Diese Prozesse müssen nicht nur von der UV-Dosis, sondern auch von der Überlebensrate abhängig sein, also auch von der Schadensmenge, die nach der Reparatur präletaler Schäden übrig geblieben ist. Durch eine solche Abhängigkeit von der Überlebenswahrscheinlichkeit ist es möglich, daß

die gleichen dosisabhängigen Prozesse im rad2-20 Stamm in einem niedrigeren Dosisbereich ablaufen als in dem RAD Diplonten, da im rad2-20 Diplonten die Reparaturkapazität gegenüber präletalen Schäden stark reduziert ist (Abb. 5 und Tab. 2).

Auffällig ist die Dosisabhängigkeit der intergenischen Rekombinationsraten (Rfr) des RAD und des rad2 20 Diplonten (Abb. 11 und 12). Erst steigen die intergenischen Rfr mit der Dosis an, fallen aber ab 1.4×10^3 bzw. 120 erg mm^{-2} wieder stark ab. Dies bedeutet nicht unbedingt eine erhöhte Resistenz der rekombinanten Zellen bis zu einem kritischen Dosisbereich, sondern scheint eher darauf zu deuten, daß zwei gegenläufige Prozesse (Induktion und Inaktivierung) nebeneinander stattfinden. Die Induktion überwiegt bis zu einer Überlebensrate von 10^{-1} bei dem RAD Diplonten und bis 5×10^{-3} bei dem rad 2-20 Diplonten. Nach jeweils höheren UV-Dosen wirkt die Inaktivierung stärker als die Induktion.

Das Verhalten des r_1^S Diplonten unterscheidet sich deutlich von dem des RAD und des rad2-20 Diplonten. Zwischen 360 und 840 erg mm^{-2} ist die Zahl der UV-induzierten intergenischen Rekombinationsereignisse 30-mal höher als bei dem RAD Stamm (Abb. 10). Auch die intergenischen Rfr sind bei dem r_1^S Diplonten erheblich höher als bei dem Wildtyp-Stamm: der r_1^S Diplont erreicht nach 600 erg mm^{-2} bereits eine Rfr von 9×10^{-1} . Der RAD Diplont hingegen erreicht erst nach einer UV-Dosis von 1680 erg mm^{-2} eine maximale Induktion bis 2.7×10^{-2} . Der DRF des r_1^S Diplonten für Überlebende bei LD_1 ist 1.6, aber die induzierten Rfr liegen fast um das 100-fache über denen des RAD Diplonten. Der r_1^S zeigt im Vergleich zum Wildtyp zwei Unterschiede bezüglich der intergenischen Rekombination:

1. Die Zahl der Rekombinationsereignisse ist im r_1^S Diplonten deutlich höher.
2. Die intergenischen Rfr fallen nach höheren UV-Dosen nicht wieder ab, sondern bleiben plateau-artig auf dem hohen Niveau.

Beide Unterschiede könnten durch eine der folgenden Hypo-

thesen erklärt werden:

- Die r_1^S Mutation bewirkt, daß der Prozeß, durch den Rekombinanten entstehen, wirksamer ist als bei dem RAD Diplonten.
- Die erhöhte Induktion von Rekombinanten ist auf eine Erhöhung bestimmter DNS-Schäden zurückzuführen (z.B. Deletionen und/oder Duplikationen, Strangbrüche usw.).
- Bei den Rekombinanten des r_1^S tritt ein Resistenzgewinn gegenüber den nicht-rekombinierten Zellen auf, sodaß während der UV-Bestrahlung Rekombinanten selektioniert werden.

Die erste Möglichkeit erscheint fragwürdig und ist schwer zu überprüfen. Bei der zweiten Möglichkeit wird lediglich angenommen, daß ein unverändertes Rekombinationssystem (Rekombination oder REC Reparatur) mehr Substrat, nämlich DNS-Schäden, zur Verfügung hat. Demnach müßte die r_1^S Mutation ein anderes (Reparatur- ?) System betreffen. Aufgrund der Isogenität der Stämme ist die dritte Möglichkeit recht unwahrscheinlich. Wären die Rekombinanten des r_1^S Diplonten resistenter gegenüber UV, müßte dies für die Rekombinanten der anderen Stämme ebenfalls zutreffen.

HOLLIDAY (1968) berichtet von einer sich ähnlich verhaltenden Ustilago-Mutante, wie auch SHANFIELD und KÄFER (1969) von Aspergillus und SCHROEDER (1970) von Neurospora. Diese Autoren nehmen an, daß eine Zunahme von Deletionen und/oder Duplikationen der DNS mit einer Zunahme an ungleichen Rekombinationsereignissen gekoppelt ist. Es ist denkbar, daß eine defekte Polymerase-Funktion im EXR System Deletionen und/oder Duplikationen verursachen kann. Ob dies bei den obengenannten Stämmen und dem r_1^S Diplonten der Fall ist, konnte noch nicht experimentell bewiesen werden.

4.3.2. Intragenische Rekombinanten

Die RAD, r_1^S und rad2-20 Diplonten ähneln sich in Bezug auf

die Induktion intragenischer Rekombinationsereignisse. Bei dem r_2^S konnten keine Rekombinanten festgestellt werden.

Eine Darstellung der UV-Induktion von intragenischen Rekombinanten zeigt für den RAD, den r_1^S und den rad2-20 Diplonten ein Maximum in stammspezifischen Dosisbereichen (Abb. 10). Diese sind gegenüber den Maxima der intergenischen Rekombinanten in einen jeweils höheren Dosisbereich verschoben. Bei dem RAD und dem rad2-20 Diplonten werden maximal die gleichen Mengen intragenischer Rekombinanten induziert, während der r_1^S nach 360 erg mm^{-2} 130-mal so viele intragenischen Rekombinanten induziert wie der Wildtyp RAD Diplont.

Der Vorgang, durch den intragenische Rekombinanten entstehen, zeigt für die drei Diplonten eine ähnliche Abhängigkeit von der UV-Dosis und von der Überlebenswahrscheinlichkeit (Abb. 10, 11 und 12).

Die Dosisabhängigkeit der intragenischen Rfr (Abb. 12) könnte formal durch ein kinetisches Modell mit variabler Trefferzahl in verschiedenen Dosisbereichen oder durch die UV-Induktion eines Systems, das Rekombinanten produziert, erklärt werden. In einem kinetischen Modell (s. z.B. MAYER 1969) stellt n die Zahl der Treffer dar, die einen Effekt hervorrufen. Ein derart arbeitendes System müßte in dem rad2-20 Diplonten im Dosisbereich $< 170 \text{ erg mm}^{-2}$ pro Treffer 1 Rekombinationsereignis erzeugen, aber im Dosisbereich $> 170 \text{ erg mm}^{-2}$ stattdessen 6 Rekombinanten pro Treffer. Bei den RAD und r_1^S Diplonten liegen ähnliche Verhältnisse vor. Zwischen 300 und 1700 erg mm^{-2} müßten im RAD Diplonten pro Treffer 0.5 Rekombinanten entstehen, aber nach UV-Dosen $> 1700 \text{ erg mm}^{-2}$ wären es 3.4 Rekombinanten je Treffer. Bei dem r_1^S Diplonten werden im Bereich von 300 bis 800 erg mm^{-2} jedoch gar keine intragenischen Rekombinanten induziert, nach UV-Dosen $> 800 \text{ erg mm}^{-2}$ aber 4.5 Rekombinanten pro Treffer. Eine ausschließliche Dosisabhängigkeit eines Mechanismus, der intragenische Rekombinanten erzeugt, sollte in allen Stämmen identische Werte zur Folge haben. Die stammbedingten Unterschiede der n -Werte, aber auch die drastische Änderung

des n -Wertes bei einem Stamm, deuten auf eine differenziertere Dosisabhängigkeit derjenigen Prozesse hin, durch die Rekombinanten entstehen.

Die n -Werte der intragenischen Rekombinationskinetik ändern sich bei dem RAD, dem r_1^S und dem rad2-20 Diplonten von niedrigen ($n = 0$ bis $n = 1$) nach höheren Werten ($n = 3.4$ bis $n = 5.6$), wenn auch in unterschiedlichen, stammspezifischen Dosisbereichen (Abb. 12). Dieses Ergebnis könnte als Hinweis für die Induktion eines Systems gewertet werden, das Rekombinanten erzeugt. Es bleibt z.Z. noch unklar, ob dieses System das REC System oder ein anderes ist. Mit der Mutationskinetik des rad2-20 Haplonten erhielt ECKARDT (1974) ähnliche Ergebnisse, die als Hinweis für die Induktion eines fehlerhaften Reparatursystems gedeutet wurden. Bisher ist der biochemische Beweis für die Induktion eines Reparatursystems, das Rekombinanten produziert, nur an *Ustilago* erbracht worden (HOLLIDAY 1971, RESNICK und HOLLIDAY 1971).

4.3.3. Besteht ein Zusammenhang zwischen UV-induzierten inter- und intragenischen Rekombinationsereignissen?

Das Rekombinationsmodell von MESELSON und RADDING (1975) (s. 1.2 und Abb. 1) ist aus Ergebnissen entwickelt worden, die mit Bakteriophagen, Bakterien, Ascomyceten und Lilien-Antheren erzielt wurden (Zusammenfassende Übersichten bei: RADDING 1973, HOTCHKISS 1974, MESELSON und RADDING 1975), und läßt sich daher für prokaryotische und eukaryotische Systeme anwenden. Nach diesem Modell können inter- und intragenische Rekombinanten durch einen Prozeß entstehen.

Die in Experimenten gefundenen Kolonien mit rekombinantem Phänotyp (in dieser Arbeit his bzw. ADE) müssen nicht ausschließlich aus einem Rekombinationsvorgang in dem his3 bzw. ade2 Gen hervorgegangen sein. Rekombinanten können ebenso durch Isomerie entstehen, wenn in benachbarten Genen ein "cross-over" stattfindet, oder auch durch branch migration (vgl. Abb. 1).

Im Rahmen der gegebenen Fragestellung ("Wird die Rekombination bei den Diplonten mit verschiedenen rad Genen durch UV-Bestrahlung beeinflusst und wie?") ist zunächst wichtig, daß Rekombinanten mit dem verwendeten System erfaßt werden können. Ob diese Rekombinanten durch Vorgänge innerhalb des untersuchten Markers entstanden, ist nicht von primärer Bedeutung.

Die vorhandenen Modellvorstellungen über den Rekombinationsablauf gelten für die spontane mitotische und meiotische Rekombination. Über den molekularen Verlauf des Rekombinationsvorganges in UV-bestrahlten Zellen ist noch nichts bekannt. Die Annahme erscheint jedoch berechtigt, daß die Modellvorstellungen gleichermaßen auf bestrahlte und unbestrahlte Zellen angewendet werden können.

Bei dem Versuch, die Unterschiede zwischen UV-induzierten inter- und intragenischen Rekombinationsraten (Abb. 12) zu erklären, sollte auch die Entfernung zwischen den jeweils rekombinierenden Markern beachtet werden. *I n t r a g.* Rekombinanten können nur durch Rekombination innerhalb des *ade2* Gens entstehen. Möglicherweise entspricht der *intrag.* Rekombinationsvorgang den Vorstellung des Rekombinationsmodells, wenn dieser Vorgang nicht nur durch einen Einzelstrangbruch, sondern auch durch $\overline{\text{P}}\overline{\text{P}}$ und DNA-protein cross-links ausgelöst werden kann (HOWARD-FLANDERS, persönliche Mitteilung). Die Änderung in der intragenischen Rekombinationskinetik ließe sich dann folgendermaßen vorstellen: Nach jeweils niedrigen UV-Dosen (= hohe Überlebenswahrscheinlichkeit) entspricht die Dosisabhängigkeit der *intrag.* Rfr der rekombinationsauslösenden Wirkung der UV-induzierten Schäden. Nach jeweils höheren UV-Dosen, die einen stammspezifischen "kritischen" Wert überschritten haben (vgl. 4.2.) werden weitere Reparaturmechanismen von der Zelle eingeschaltet, wie z.B. das REC System. Ein Zusammenwirken von Rekombination, der erhöhten Zahl an UV-induzierten Schäden und von Reparaturmechanismen, die Rekombinanten erzeugen oder rekombinogene Schäden produzieren würde die *intrag.* Rekombinationshäufigkeit in diesem höheren Dosisbereich schneller ansteigen lassen.

Bei der *i n t e r g.* Rekombination findet der Rekombina-

tionsprozeß nicht innerhalb des *his3* Gens statt. Sein Ursprung kann irgendwo zwischen dem Zentromer und dem *his3* Locus sein. Die intergenischen Rfr sind daher höher als die intragenischen. Mehrere "cross over" können gleichzeitig in diesem Abschnitt stattfinden. Es ist möglich, daß ein erstes Rekombinationsergebnis in seiner Auswirkung auf Außenmarker durch ein zweites genotypisch und phänotypisch "annulliert" wird.

Die Kinetik der intergenischen Rfr entsteht aus dem Gleichgewicht von Rekombinationsvorgängen, UV-induzierten rekombinogenen Schäden und Reparaturprozessen. Im Gegensatz zu der intragenischen Rekombination muß hier der Abschnitt zwischen dem Zentromer und dem *his3* Marker berücksichtigt werden. Durch diese Entfernung ist allein die Wechselwirkung von mehreren räumlich aufeinanderfolgenden Rekombinationen nach UV-Bestrahlung nicht abzuschätzen. Die Dosisabhängigkeit von Rekombinationsvorgängen in Chromosomen, die dicht mit Markern besetzt sind, wird vielleicht Aussagen über den Rekombinationsvorgang nach UV-Bestrahlung eher ermöglichen.

4.3.4. Einfluß der Nachbehandlungen auf die UV-induzierten Rekombinanten

Für die Reparatur von prärekombinogenen Schäden sollten grundsätzlich dieselben Annahmen und Überlegungen gelten wie für die Reparatur von präletalen Schäden. Die Ausführungen von 4.2. werden deshalb als Grundlage für diesen Abschnitt vorausgesetzt.

Eine Behandlung mit photoreaktivierendem Licht nach UV-Bestrahlung hat eine Reduktion der inter- und intragenischen Rfr des RAD, r_1^S und rad2-20 Diplonten zur Folge (Abb. 15). Das Ausmaß dieser Reduktion ist nicht nur stammspezifisch, sondern bei inter- und intragenischen Rfr jeweils unterschiedlich groß. Die in allen Fällen auftretende Reduktion der Rfr durch PhR kann als indirekter Beweis dafür angesehen werden, daß mindestens ein Teil der induzierenden Schäden $\hat{P}\hat{P}$ sind.

Nach LHR werden die UV-induzierten i n t e r g. Rfr bei den RAD, r_1^S und rad2-20 Diplonten nur teilweise reduziert und in einem jeweils stammspezifischen Dosisbereich sogar induziert (Abb. 17). Bei den i n t r a g. Rfr wirkt LHR jedoch in allen Stämmen reduzierend.

Die Induktion von i n t e r g. Rekombinanten durch LHR über die UV-Induktion hinaus (s. auch Abb. 18) läßt sich für die einzelnen Stämme folgendermaßen erklären:

Bei dem Wildtyp RAD Diplonten arbeiten EXR, REC, andere Reparatursysteme und auch Rekombinationsvorgänge in bestrahlten Zellen während der Dunkelhaltung gleichzeitig nebeneinander. Im Bereich hoher Überlebenswahrscheinlichkeit können EXR und Rekombination (nicht REC Reparatur) in diploiden Zellen miteinander konkurrieren. Schäden, die sich in einem rekombinierenden DNS-Stück befinden, können wahrscheinlich nicht gleichzeitig durch die EXR Endonuklease erkannt werden oder gar durch EXR repariert werden. Es ist denkbar, daß der Rekombinationsvorgang die $\hat{P}\hat{P}$ nicht beseitigt, sondern nur Rekombinanten hervorruft.

Somit würde durch Rekombination die Zahl der präletalen Schäden nicht verringert, wohl aber die Zahl der Rekombinanten erhöht. Ein effizientes EXR System könnte gleichzeitig ihm zugängige $\hat{P}P$ reparieren. Mit zunehmender UV-Dosis steigt jedoch die Zahl der UV-induzierten Schäden an; dabei verringert sich die Überlebenswahrscheinlichkeit, wenn die Menge der nicht-reparierten Schäden zunimmt. Es ist denkbar, daß ein weiteres Reparatursystem wie z.B. das REC System, bei einer bestimmten "Belastung" von der Zelle eingeschaltet wird. Der dosisabhängige Kurvenverlauf wird dann durch das Gleichgewicht der verschiedenen Reparatursysteme mit der Rekombinanten-induzierenden Wirkung der $\hat{P}P$ bestimmt.

- Für den EXR-defekten rad2-20 Diplonten kann dasselbe Modell angewendet werden. Das in diesem Stamm defekte EXR System kann auch nach niedrigen UV-Dosen keine Schäden entfernen. Möglicherweise wird dadurch bei niedrigen UV-Dosen bereits die kritische Menge an nicht-reparierten Schäden erreicht, sodaß bei diesem Stamm das REC System induziert wird. Gleichzeitig können auch Rekombinationsvorgänge ablaufen. Es ist denkbar, daß ein Teil der Schäden nach geringen UV-Dosen durch Rekombination und das REC System "abgefangen" werden. REC Reparatur setzt aber eine DNS-Replikation nach der UV-Bestrahlung voraus; sie muß daher recht langsam arbeiten. So ist es zu verstehen, daß nach höheren UV-Dosen bei LHR noch "freistehende" $\hat{P}P$ zusätzlich rekombinogen wirken. Bei noch höheren UV-Dosen ist die Inaktivierung größer als die Erzeugung von Rekombinanten durch Rekombination und REC Reparatur.
- Bei dem r_1^S Diplonten beträgt die UV-Induktion von Rekombinanten fast 100% (9×10^{-1}) ohne Nachbehandlung, sodaß durch LHR keine signifikante Erhöhung der Rfr eintritt. Bemerkenswert ist ein Vergleich der RZ nach UV+LHR (Abb. 18) mit den Rfr nach LHR (Abb. 17). Die Zahl der Rekombinanten liegt nach UV+LHR von 360 bis 1200 erg mm^{-2} zunehmend über den UV-induzierten Werten, während sich die Kur-

ven der UV-induzierten Rfr mit und ohne LHR fast decken. Diese Erhöhung der RZ nach UV+LHR läßt sich in derselben Weise erklären wie bei dem RAD und dem rad2-20 Diplonten. Im Gegensatz zu diesen beiden Stämmen jedoch wurden die intergenischen Rekombinanten nach LHR bei dem r_1^S Diplonten fast ausschließlich als ganze Kolonien gefunden. Diese Tatsache weist auf eine mögliche Erklärung für die scheinbare Diskrepanz in der Auswirkung von LHR auf die intergenischen Rfr bzw. RZ (Abb. 17 und 18). Ganze rekombinante Kolonien können folgendermaßen entstehen:

- Das Rekombinationsereignis mit darauffolgender Zellteilung findet noch während der Pufferhaltung statt.
- Aus der Zellteilung nach einem Rekombinationsereignis gehen eine teilungsfähige und eine "tote" Zelle hervor.
- Mutationsereignisse täuschen Rekombinanten vor.
- Reparatursysteme verursachen Sekundärschäden, die ihrerseits rekombinogen wirken.

Die erste Möglichkeit ist unwahrscheinlich, da ein Wachstum der Zellen während der Pufferhaltung nicht beobachtet wurde. Die zweite Möglichkeit kann mit der verwendeten Methode weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Sie besagt, daß UV-induzierte Schäden "herausrekombiniert" werden. Möglich ist, daß ein Teil der UV-induzierten Schäden durch Rekombinationsvorgänge umverteilt werden. Es erscheint jedoch fragwürdig, daß Rekombinanten, besonders nach höheren UV-Dosen, ausschließlich durch solch einen Vorgang entstehen. Die dritte Möglichkeit ist ebenfalls unwahrscheinlich, da die Mutationsraten maximal 1% der intergenischen Rfr betragen. Die letzte Möglichkeit nimmt an, daß der r_1^S Diplont während LHR präletale Schäden in einem gewissen Maß reparieren kann. Möglicherweise werden UV-induzierte Schäden wie $\hat{P}P$ durch ein defektes EXR System beseitigt, aber der EXR Vorgang wird nicht vollständig durchgeführt. Dadurch können sekundäre Schäden an der DNS entstehen (z.B. Lücken, Einzelstrangbrüche), die ihrerseits Rekombinationsvorgänge auslösen können. Eine fehlerhafte Polymerase könnte beispielsweise größere gaps in der

DNS hinterlassen, die nur durch einen Rekombinationsvorgang geschlossen und repariert werden können. So wäre es möglich, daß alle Überlebenden (= alle aufwachsenden Klone) Rekombinanten sind. Dies bedeutet eine Rekombinationshäufigkeit von 100%.

Nach UV+PhR+LHR tritt bei den inter- und intragenischen Rfr des RAD Diplonten ein unterschiedlicher Effekt auf (Abb. 20). Auf die *i n t e r g.* Rfr wirkt sich die doppelte Nachbehandlung induzierend aus. Die Rfr steigen über die reduzierten Werte nach UV+PhR hinaus und bei höheren UV-Dosen sogar über diejenigen nach UV+LHR (vgl. auch Abb. 18 und 21). Demnach müßte während LHR ein Prozeß stattfinden, der Rekombinanten induziert. Andererseits ist es ebenfalls denkbar, daß ein Teil der $\hat{P}P$ während der Photoreaktivierung durch konkurrierende EXR-Enzyme oder andere Dunkelreparaturenzyme "maskiert" sind. Während der Pufferhaltung nach PhR können diese Enzym-Substrat-Komplexe dissoziieren und die DNS-Schäden entfernt werden (z.B. durch EXR) oder rekombinogen wirken (z.B. durch das Auslösen eines Rekombinationsvorganges oder durch REC Reparatur). Je höher die UV-Dosis, desto mehr $\hat{P}P$ und andere Schäden können Rekombinationen auslösen. Eine Nachbehandlung mit PhR+LHR reduziert die UV-induzierten *i n t r a g.* Rfr. Hier scheint der induzierende Einfluß der LHR-Behandlung zwar den reduzierenden Einfluß der PhR-Behandlung zu überlagern; die intragenischen Rfr Werte liegen aber immer unter den UV-induzierten. Eine starke Induktion von Rekombinationsereignissen, wie bei den intergenischen Rfr, wird hier wohl kaum während der Reparatur stattgefunden haben.

Auf die inter- und intragenischen Rfr des rad2-20 Diplonten wirkt PhR+LHR stark reduzierend. Nach der Doppelbehandlung werden die intergenischen Rfr auf Werte reduziert, die den spontanen entsprechen. Es ist wahrscheinlich, daß in diesem EXR-defekten Stamm ein großer Teil der Schäden während PhR repariert wird. Die nicht-photoreaktivierten Schäden können während der

anschließenden Pufferhaltung durch REC, Rekombination, PhR-stimulated-gap-filling oder weitere Reparaturmechanismen repariert werden.

Bei dem r_1^S Diplonten bewirkt die Doppelbehandlung keine signifikante Reduktion der inter- und intragenischen Rfr gegenüber den Werten nach UV+PhR. Die intergenischen RZ werden jedoch bei diesem Stamm durch PhR+LHR deutlich über den Werten nach UV erhöht. Dies kann als weiterer Hinweis dafür interpretiert werden, daß die Dunkelreparatur in dem r_1^S Diplonten in einem Reparaturmechanismus oder in einer Reparaturfunktion (wie z. B. Polymerase oder Ligase) defekt ist.

4.4. Einfluß der rad Gene auf die UV-induzierte Mutation

Photoreaktivierung und das EXR System sind bei Hefen mit aller Wahrscheinlichkeit nicht an der UV-induzierten Mutagenese beteiligt (RESNICK 1968 und 1.3). LEMONTT (1970, 1971, 1972) konnte zeigen, daß das REV System an der Entstehung von UV-induzierten Mutationen bei Hefen beteiligt ist. Wahrscheinlich verursachen die UV-induzierten $\dot{P}$ P bei der DNS-Replikation Sekundärschäden (Additionen, Deletionen, Transitionen: MEISTRICH und DRAKE 1972), die dann z.T. fehlerhaft repariert werden.

Stämme, die ein defektes EXR System besitzen, sollten demnach mehr UV-induzierte Mutanten aufweisen als Stämme, deren EXR System intakt ist. Eine Voraussetzung hierfür ist, daß "fehlerhaft" arbeitende Reparaturprozesse funktionsfähig vorhanden sind. Von Stämmen, die aufgrund eines Blocks im EXR System UV-sensibel sind, wie z.B. der rad2-20 Diplont, ist eine höhere Mutationsinduktion zu erwarten als von dem Wildtyp RAD Diplonten.

Alle vier untersuchten homozygoten rad Stämme (h -RAD, h - r_1^S , h - r_2^S und h -rad2-20) sind in der Lage, Mutanten zu induzieren. (Abb. 24). Die UV-sensiblen Diplonten lassen sich nach ihrem UV-induziertem Mutationsverhalten (Abb. 25) in 2 Gruppen zusammenfassen:

- Diplonten, die eine höhere Mutationsrate erreichen als der Wildtyp-Stamm: h -rad2-20 und h - r_1^S
- Diplonten, deren UV-induzierte Mutationsraten niedriger sind als beim Wildtyp-Stamm: h - r_2^S .

Das Verhalten der h - r_1^S und h - r_2^S Diplonten ist erstaunlich, da die zugehörigen r_1^S und r_2^S Haplonten eine sehr ähnliche Mutationsinduktion zeigten, die in derselben Größenordnung war wie diejenige des RAD Haplonten (ECKARDT 1974). Der h -RAD Diplont hat dasselbe Mutationsverhalten wie der RAD Haplont: die Kurven der UV-induzierten Mutationsraten fallen zusammen. Bei UV-Dosen $> 600 \text{ erg mm}^{-2}$ entstehen in dem h - r_1^S Diplonten mehr Mutanten als in dem r_1^S Haplonten (und dem RAD Haplonten). Die

h-rad2-20 und h-r₂^S Diplonten induzieren beide weniger Mutanten als die zugehörigen Haplonten (ECKARDT et al. 1975). Offenbar ist nicht nur der Einfluß des rad Gens für die UV-induzierte Mutagenese von Bedeutung, sondern auch der physiologische "Hintergrund" in dem es sich befindet. Diese Unterschiede in dem Mutationsverhalten haploider und diploider Stämme hängen möglicherweise von Reparaturvorgängen ab, die durch den diploiden Zustand begünstigt werden (s. 4.2.). Diese Prozesse sind noch nicht näher charakterisiert.

Die Kinetik der Mutationsinduktion bei dem h-RAD, h-r₁^S, h-r₂^S und h-rad2-20 Diplonten (Abb. 26) ähnelt der Kinetik bei den zugehörigen Haplonten (ECKARDT 1974, ECKARDT et al. 1975). In dem niedrigeren Dosisbereich läßt sich bei dem rad2-20 Haplonten und dem h-rad2-20 Diplonten eine direkte Proportionalität zwischen der Dosis und der Mutationshäufigkeit feststellen ($n = 1$). In höheren Dosisbereichen zeigt der rad2-20 Haplont, im Gegensatz zu dem h-rad2-20 Diplonten, eine quadratische Abhängigkeit von der UV-Dosis, wie es auch die UV-induzierten Mutationsraten der RAD, r₁^S und r₂^S Haplonten und Diplonten es tun. Die Ähnlichkeit der Mutationskinetiken wirft u.a. zwei Fragen auf:

- Was bewirkt die Änderung in der Mutationskinetik der rad2-20 Stämme?
- Haben die anderen Stämme (RAD, r₁^S und r₂^S) in niedrigen Dosisbereichen auch eine direkte Proportionalität zwischen der UV-Dosis und der Mutationshäufigkeit?

Aufgrund der ähnlichen, sogar fast identischen Mutationskinetik kann zunächst geschlossen werden, daß die unterliegenden Mutationsmechanismen bei Haplonten und Diplonten der untersuchten rad Gene gleich sind. Demnach ist zu erwarten, daß auch bei den RAD, r₁^S und r₂^S Stämmen in sehr niedrigen Dosisbereichen eine lineare Abhängigkeit der Mutationsraten von der UV-Dosis besteht. Neuere Versuche, in denen methodische Schwierigkeiten im niedrigen Dosisbereich umgangen wurden, bestätigten diese Annahme (ECKARDT, unveröffentlicht).

Eine Erklärung für die quadratische Abhängigkeit der Muta-

tionsraten von der induzierenden UV-Dosis, die aus einer linearen Abhängigkeit hervorgeht, wäre die Induktion eines fehlerhaft arbeitenden Reparatursystems. Andere Möglichkeiten, wie z.B. die Multi-Treffer-Theorie, sind von ECKARDT (1974) bereits ausführlich besprochen und bezüglich der r_1^S , r_2^S und rad2-20 Gene gegeneinander abgewogen worden. Die mit den RAD, r_1^S , r_2^S und rad2-20 Haplonten und Diplonten erzielten Ergebnisse lassen sich am besten mit der Hypothese einer Induktion von einem fehlerhaft arbeitenden Reparatursystem erklären.

Durch PhR werden in allen h-rad Stämmen die UV-induzierten Mutationsraten reduziert (Abb. 28). Wie bei den Rfr, stellen Δ PP einen großen Teil der Schäden dar, die Mutationsereignisse verursachen.

Ein reduzierender Einfluß von LHR auf die Mutationsraten ist nur bei dem h- r_2^S Diplonten vorhanden (Abb. 30). Anders ist es mit dem Einfluß der Doppelbehandlung auf die UV-induzierten Mutationsraten. Bei dem h-rad2-20 Diplonten, ganz besonders aber bei dem h- r_2^S Diplonten, werden die UV-induzierten Mutationsraten durch PhR+LHR stark reduziert (Abb. 31). Dieses Ergebnis deutet auf ein gut arbeitendes, fehlerfreies Dunkelreparatursystem hin, z.B. PhR-stimulated-gap-filling (BRIDGES und SEDGEWICK 1974).

4.5. Ist eine Zuordnung der r_1^S und r_2^S Mutationen in eins der bekannten Reparatursysteme möglich?

In dieser Arbeit liegen Ergebnisse vor, die den Einfluß von UV-Bestrahlung, PhR, LHR und PhR mit anschließendem LHR auf die Überlebenswahrscheinlichkeit, die mitotische inter- und intragenische Rekombination und die Mutation bei drei UV-sensiblen Diplonten darstellen. Diese Versuche sind mit dem RAD, r_1^S , r_2^S und rad2-20 Diplonten durchgeführt worden. Die RAD und rad2-20 Stämme galten als "Kontrollstämme": der RAD Diplont als Wildtyp-Stamm und der rad2-20 Diplont als Stamm mit einem defekten EXR System (UNRAU et al. 1971, RESNICK und SETLOW 1972). Ein Ziel der Versuche war, anhand des UV-induzierten Rekombinations- und Mutationsverhaltens eine Aussage darüber machen zu können, welches Reparatursystem durch die r_1^S bzw. r_2^S Mutation blockiert ist.

Der r_1^S Diplont zeigt eine mittlere UV-Sensibilität, einen Resistenzgewinn gegenüber dem r_1^S Haplonten und eine starke UV-Induktion von Rekombinations- und Mutationsereignissen. Dieser Stamm kann präletale, prärekombinogene und prämutative UV-induzierte Schäden photoreaktivieren. Hingegen ist die Fähigkeit zur Dunkelreparatur in dem r_1^S Diplonten anscheinend reduziert. LHR bewirkt keine signifikante Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit nach UV-Bestrahlung und ebenso keine signifikante Reduktion der UV-induzierten Rekombinations- und Mutationsraten. Die Kurven der Überlebenswahrscheinlichkeit, der Rekombinations- und Mutationshäufigkeit nach UV+PhR+LHR fallen fast mit denen nach UV+PhR zusammen. Die UV-induzierten Mutationsraten sind in dem r_1^S Diplonten erheblich höher als bei dem RAD Diplonten; die UV-induzierten Mutationsraten sind jedoch bei den r_1^S und RAD Haplonten gleich.

Diese Eigenschaften der r_1^S Diplonten und Haplonten sind in verschiedenen Zusammenhängen durch ein EXR System erklärt worden, das in der Polymerase- oder Ligase-Funktion blockiert ist (4.2, 4.3., ECKARDT 1974). Ein Vergleich der r_1^S Diplonten und Haplonten mit pol^- und lig^- Mutanten bei Bakterien zeigt Ähnlichkeiten in der UV-Sensibilität (GROSS und GROSS 1969, KANNER et al. 1970,

BOYLE et al. 1970, PAULING und HAMM 1968, 1969) und den UV-induzierten Mutationsraten KONDO et al. 1970, ISHII und KONDO 1972, WITKIN 1972, KONDO 1973).

Pol^- Mutanten bei Bakterien entsprechen dem Wildtyp in ihren UV-induzierten Rekombinationsraten (GROSS und GROSS 1969). Dies trifft für den r_1^S Diplonten nicht zu. Dennoch erscheint die Hypothese angebracht, das Verhalten des r_1^S Diplonten (und Haplonten) mit einer blockierten Polymerase- oder Ligase-Funktion zu erklären. Weiterführende Versuche mit biochemischen Methoden sollten eine Differenzierung zwischen den beiden Möglichkeiten gestatten.

Der r_2^S Diplont weist eine mittlere UV-Sensibilität auf, zeigt aber keinen Resistenzgewinn gegenüber dem r_2^S Haplonten. Eine UV-Induktion von mitotischen Rekombinationsereignissen wurde nicht gefunden. Die UV-induzierten Mutationsraten des r_2^S Diplonten liegen deutlich unter denen des RAD Diplonten, obwohl sich die r_2^S und RAD Haplonten gleich verhalten. Der r_2^S Diplont kann präletale und prämutative UV-induzierte Schäden photoreaktivieren. Ein gutes Dunkelreparaturvermögen ist bei dem r_2^S Diplonten vorhanden; es äußert sich in einer Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit und in einer Reduktion der UV-induzierten Mutationsraten nach LHR. Nach der Doppelbehandlung (PhR+LHR) ist die Überlebenswahrscheinlichkeit geringer als nach den jeweiligen Einzelbehandlungen; die UV-induzierten Mutationsraten sind jedoch auf Werte reduziert, die fast denen ohne Bestrahlung entsprechen.

Es erscheint naheliegend, die r_2^S Mutation dem REC System zuzuordnen. Die fehlende Induktion von Rekombinanten, die reduzierten Mutationsraten, die mittlere UV-Sensibilität und das Fehlen eines Resistenzgewinnes des Diplonten gegenüber dem Haplonten deuten auf ein Reparatursystem, das im Diplonten begünstigt wird und mit der Rekombination in Zusammenhang steht. Rec^- Mutanten bei Bakterien zeigen z.T. eine mittlere UV-Sensibilität und eine reduzierte Induktion von Rekombinanten und Mutanten (vergleichende Zusammenfassung bei STORM 1971 und CLARK

1973).

Das gute LHR-Vermögen weist auf ein intaktes EXR System hin (SETLOW und BOLLUM 1968).

Nach Abschluß der Versuche für diese Arbeit wurde die r_2^s Mutation von GAME und MORTIMER (1974) aufgrund von Versuchen mit Röntgenstrahlen als rad9-4 in die Nomenklatur der rad Gene aufgenommen. Diese Mutation verursacht eine hohe Röntgen-Sensibilität, wie es Versuche von AVERBECK (1970) schon gezeigt hatten. LASKOWSKI und LEHMANN-BRAUNS (1973) erzielten ähnliche Ergebnisse in Experimenten mit N-methyl-N-nitroso-N-nitroguanidin. LAWRENCE (1974) ordnet die rad9 Allele aufgrund des Mutationsverhaltens in das REC System ein.

Für Vorversuche, die in jüngster Zeit durchgeführt wurden, sind r_2^s Diplonten aus anderen Eltern neu zusammengekreuzt worden. Diese Diplonten zeigen z.T. die Fähigkeit, spontan zu rekombinieren. Eine UV-induzierte Rekombination konnte an diesen Stämmen jedoch nicht festgestellt werden. Vieles in dem Verhalten der r_2^s Diplonten, die in dieser Arbeit verwendet wurden, weist auf einen Block im REC Reparatursystem hin. Es muß jetzt aber erst geklärt werden, ob dieses Verhalten durch den physiologischen Zustand der Zellen bedingt ist, oder durch die r_2^s ($\equiv$ rad9-4) Mutation.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde der Einfluß von drei *rad* Genen auf die Lebensfähigkeit, die mitotische Rekombination und die Mutation nach UV-Bestrahlung und verschiedenen Nachbehandlungen untersucht. Hierzu wurden für die r_1^S , r_2^S oder die *rad2-20* Mutation homozygote Diplonten verwendet und ihr Verhalten mit entsprechenden Wildtyp RAD Diplonten verglichen.

Die r_1^S und r_2^S Diplonten zeigten gegenüber dem Wildtyp RAD Diplonten eine mittlere, der *rad2-20* Diplont eine hohe UV-Sensibilität. Durch UV-Bestrahlung wurden bei dem RAD, dem r_1^S und dem *rad2-20* Diplonten inter- und intragenische Rekombinanten induziert. Diese Induktion war bei dem r_1^S Diplonten erheblich höher als bei dem RAD Stamm und nach niedrigen UV-Dosen auch bei dem *rad2-20* Diplonten. Bei dem r_2^S Diplonten konnte keine UV-Induktion von Rekombinationsereignissen (RE) festgestellt werden. Mutanten wurden bei allen vier *rad* Diplonten durch UV-Bestrahlung induziert; bei den r_1^S und *rad2-20* Diplonten mehr als im Wildtyp RAD Stamm, bei dem r_2^S Diplonten weniger.

Durch eine Nachbehandlung mit PhR wurden in allen Stämmen präletale, rekombinogene und prämutative Schäden repariert.

Eine Nachbehandlung mit liquid holding bewirkte in den vier Diplonten nur eine geringe Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit. Die Zahl der UV-induzierten RE aber wurde nach LHR stammspezifisch beeinflusst. Bei dem r_1^S Diplonten wurde die Zahl der intragenischen UV-induzierten RE durch LHR stark reduziert, die der intergenischen RE jedoch erhöht. Bei dem Wildtyp RAD und dem *rad2-20* Diplonten wurde die Zahl der UV-induzierten Rekombinationsereignisse teils reduziert, teils erhöht. Ein Einfluß von LHR auf die UV-induzierten Mutationsraten wurde nur bei dem r_2^S Diplonten (und da reduzierend) gefunden.

Nach einer Doppelbehandlung mit PhR+LHR zeigten der RAD und der *rad2-20* Diplont eine starke Erhöhung der Überlebens-

wahrscheinlichkeit, während bei dem r_1^S Diplonten keine weitere Steigerung über die Werte nach PhR eintrat und bei dem r_2^S Diplonten die Überlebenswahrscheinlichkeit nach PhR+LHR sogar geringer war als nach PhR bzw. LHR. Auf die UV-induzierten Rekombinationsereignisse wirkte die Doppelbehandlung bei dem rad2-20 Diplonten stark reduzierend, bei dem Wildtyp und dem r_1^S Diplonten aber induzierend. Die Mutationsraten wurden nach PhR+LHR in allen vier Stämmen reduziert, besonders stark aber in dem r_2^S Diplonten.

Anhand dieser Ergebnisse wurden drei Fragen diskutiert:

1. Besteht ein Zusammenhang zwischen inter- und intragenischen Rekombinationsereignissen?
2. Besteht ein Zusammenhang zwischen UV-induzierter Rekombination und Reparaturmechanismen?
3. Lassen sich die r_1^S und r_2^S Mutationen in eins der bekannten Reparatursysteme einordnen?

Der unterschiedliche Einfluß von UV-Bestrahlung und den Nachbehandlungen auf die inter- und intragenischen Rekombinationsereignisse und -häufigkeiten, sowie die Tatsache, daß die Kinetiken und die Überlebensabhängigkeit der jeweiligen Rekombinationsraten sich deutlich unterscheiden, weisen darauf hin, daß nur ein geringer Zusammenhang zwischen jenen Vorgängen bestehen kann, die inter- bzw. intragenische Rekombinationen hervorrufen.

Anders ist es mit der Reparatur und der UV-induzierten Rekombination. In den Ergebnissen sind manche Hinweise dafür gegeben, daß Wechselwirkungen zwischen Rekombinationsvorgängen und Reparaturmechanismen in unterschiedlicher Weise vorhanden sind.

Alle bisher gefundenen Auswirkungen der r_1^S Mutation deuten darauf hin, daß sie dem EXR System zugeordnet werden kann. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich um eine Mutation in der Polymerase- oder Ligase-Funktion. Aufgrund der vorhandenen Ergebnisse ist es z.Z. noch nicht möglich, sich für das eine

oder andere zu entscheiden. Hingegen kann die r_2^8 Mutation mit hoher Wahrscheinlichkeit dem REC Reparatursystem zugeordnet werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts, B. M. u.
L. Frey (1970) T4 bacteriophage gene 32: A structural protein in the replication and recombination of DNA.
Nature 227, 1313-1318
- Auerbach, C. u.
D. Ramsay (1971) The problem of viability estimates in tests for reverse mutations.
Mutation Res. 11, 353-360
- Averbeck, D. (1970) Isolierung und Charakterisierung von drei UV-sensiblen Saccharomyces-Mutanten.
Dissertation, Freie Universität Berlin
- Averbeck, D., W.
Laskowski, F.
Eckardt u. E. Lehmann-Brauns (1970a) Four radiation-sensitive mutants of Saccharomyces.
Molec. gen. Genet. 107, 117-127
- Beers, R. F., R. M.
Herriott u. R. C.
Tilghman, eds. (1972) Molecular and cellular repair processes. Fifth International Symposium on Molecular Biology; The John Hopkins Medical Journal, Suppl. 1
- Boyle, J. M., M. C.
Patterson u. R. B.
Setlow (1970) Excision repair properties of an E. coli mutant deficient in DNA polymerase.
Nature 226, 708-710
- Bridges, B. A. (1969) Mechanisms of radiation mutagenesis in cellular and subcellular systems.
Ann. Rev. Nucl. Sci. 19, 139-178
- Bridges, B. A., R. E.
Dennis u. R. J. Munson (1967) Differential induction and repair of ultraviolet damage leading to true reversion and external suppressor mutations of an ochre codon in Escherichia coli B/r WP2.
Genetics 57, 897-908
- Bridges, B. A. u.
S. G. Sedgewick (1974) Effect of photoreactivation on the filling of gaps in deoxyribonucleic acid synthesized after exposure of Escherichia coli to ultraviolet light.
J. Bacteriol. 117, 1077-1081

- Broker, T. R. u. I. R. Lehman (1971) Branched DNA molecules: Intermediates in T4 recombination. J. Mol. Biol. 60, 131-149
- Brunk, C. F. (1973) Distribution of dimers in ultraviolet irradiated DNA. Nature NB 241, 74-76
- Chang, L. T. u. R. W. Tuveson (1967) Ultraviolet-sensitive mutants in Neurospora crassa. Genetics 56, 801-810
- Clark, A. J. (1973) Recombination deficient mutants of E. coli and other bacteria. Ann. Rev. Genet. 7, 67-86
- Defais, M., P. Fauquet, M. Radman u. M. Errera (1971) Ultraviolet reactivation and ultraviolet mutagenesis of λ in different genetic systems. Virology 43, 495-503
- De Lucia, P. u. J. Cairns (1969) Isolation of an E. coli strain with a mutation affecting DNA polymerase. Nature 224, 1164-1166
- Drake, J. W. (1973) The genetic control of spontaneous and induced mutation rates in bacteriophage T4. Genetics Suppl. 73, 45-64
- Eckardt, F. (1974) Spontane und UV-induzierte Mutabilität von drei UV-sensiblen Saccharomyces-Mutanten. Dissertation, Freie Universität Berlin
- Eckardt, F., S. Kowalski u. W. Lasowski (1975) The effects of three rad genes on UV induced mutation rates in haploid and diploid Saccharomyces cells. Molec. gen. Genet. 136, 261-272
- Emeis, C.-C. u. H. Gutz (1958) Eine einfache Technik zur Massenisolierung von Hefesporen. Z. Naturforschg. 13b, 647-650
- Fabre, F. (1970) A UV-supersensitive mutant in the yeast Schizosaccharomyces pombe: Evidence for two repair pathways. Molec. gen. Genet. 110, 134-143

- Fabre, F. (1972) Relation between repair mechanisms and induced mitotic recombination after UV irradiation in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. (Effects of caffeine) *Molec. gen. Genet.* 117, 153-166
- Fahr, E. (1969) Chemische Untersuchungen über die molekularen Ursachen biologischer Strahlenschäden. *Angew. Chemie* 16, 581-597
- Fisher, C. R. (1969) Enzymology of the pigmented adenine-requiring mutants of *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34, 306-310
- Fogel, S. u. R. K. Mortimer (1970) Fidelity of gene conversion in yeast. *Molec. gen. Genet.* 109, 177-185
- Fogel, S. u. R. K. Mortimer (1974) Gene conversion and mismatched base repair in hybrid DNA. *Genetics* 77 Suppl. 522
- Fortuin, J. J. H. (1971a) Another two genes controlling mitotic intragenic recombination and recovery from UV-damage in *Aspergillus nidulans*. I. UV-sensitivity, complementation and location of six mutants. *Mutation Res.* 11, 149-162
- Fortuin, J. J. H. (1971b) II. Recombination behaviour and X-ray sensitivity of *uvsD* and *uvsE* mutants. *Mutation Res.* 11, 265-277
- Fortuin, J. J. H. (1971c) III. Photoreactivation of UV-damage in *uvsD* and *uvsE* mutants. *Mutation Res.* 13, 131-136
- Fortuin, J. J. H. (1971d) IV. Genetic analysis of mitotic intragenic recombinants from *UVS*'/*UVS*', *uvsD*/*uvsD* and *uvsE*/*uvsE* diploids. *Mutation Res.* 13, 137-148
- Game, J. u. B. S. Cox (1971) Allelism tests of mutations affecting sensitivity to radiation in yeast and a proposed nomenclature. *Mutation Res.* 12, 328-331
- Game, J. u. B. S. Cox (1973) Synergistic interactions between radiation mutations in yeast. *Mutation Res.* 20, 35-44

- Game, J. u. R. K.
Mortimer (1974) A genetic study of X-ray sensitive mutants in yeast.
Mutation Res. 24, 281-292
- Ganesan, A. K. u. K.
C. Smith (1968) Dark recovery processes in Escherichia coli irradiated with ultraviolet light
I. Effect of rec⁻ mutations on liquid holding recovery
J. Bacteriol. 96, 365-373
- Ganesan, A. K. u. K.
C. Smith (1969) II. Effect of uvr genes on liquid holding recovery.
J. Bacteriol. 97, 1129-1133
- Gottesman, M. M.,
M. L. Hicks u. M.
Gellert (1973) Genetics and function of DNA ligase in Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 77, 531-547
- Gross, J. D. u. M.
Gross (1969) Genetic analysis of an E. coli strain with a mutation affecting DNA polymerase.
Nature 224, 1166-1169
- Guéron, M. u. R. G.
Shulman (1968) Energy transfer in polynucleotides.
Ann. Rev. Biochem. 37, 571-596
- Haefner, K. (1961) Zur Analyse der strahleninduzierten Inaktivierung und Mutabilität von Saccharomyces-Stämmen verschiedenen Ploidiegrades.
Diplomarbeit, Freie Universität Berlin
- Haefner, K. (1965) Untersuchungen zur Induktion prototropher Mutanten durch ultraviolettes Licht bei Saccharomyces in Abhängigkeit von Dosis und Nachbehandlung.
Dissertation, Freie Universität Berlin
- Hall, J. D. u. P.
Howard-Flanders
(1975) Temperature-sensitive resA mutant of Escherichia coli K-12: Deoxyribonucleic acid metabolism after ultraviolet irradiation.
J. Bacteriol. 121, 892-900
- Hammerl, H. u. W.
Klingmüller (1972) Influence of UV-light on gene-conversion in Neurospora.
Z. Naturforschg. 27b, 68-72
- Hanawalt, P. C. u.
R. H. Haynes (1967) The repair of DNA.
Sci. Am. 216, 36-43

- Hargrave, J. u. S. F.
Threlkeld (1973) Location of factors enhancing crossing over on linkage group I of *Neurospora*. *Genet. Res.* 21, 195-204
- Harm, W., C. S.
Rupert u. H. Harm
(1971) The study of photoenzymatic repair of UV lesions in DNA by flash photolysis in: *Photophysiology VI*; pp 279-324
A. C. Giese, ed; Academic Press,
New York, London
- Harm, W. u. B. Hille-
brandt (1962) A non-photoreactivable mutant of *E. coli* B.
Photochem. Photobiol. 1, 271-272
- Hawthorne, D. C. u.
R. K. Mortimer (1968) Genetic mapping of nonsense suppressors in yeast.
Genetics 60, 735-742
- Haynes, R. H. (1964) Role of DNA repair mechanisms in microbial inactivation and recovery phenomena.
Photochem. Photobiol. 3, 429-450
- Haynes, R. H. (1966) The interpretation of microbial inactivation and recovery phenomena.
Radiat. Res. Suppl. 6, 1-29
- Haynes, R. H. (1975) DNA repair and the genetic control of radiosensitivity in yeast.
Squaw Valley Conference on DNA Repair
(in Druck)
- Haynes, R. H., R. M.
Baker u. G. E. Jones
(1968) Genetic implications of DNA repair.
in: *Energetics and Mechanisms in Radiation Biology*; pp 425-465, G. O. Philips, ed.; Academic Press, New York
- Hill, R. (1965) Ultraviolet induced lethality and reversion to prototrophy in *Escherichia coli* strains with normal and reduced dark repair ability.
Photochem. Photobiol. 4, 563-568
- Holliday, R. (1968) Genetic recombination in fungi.
in: *Replication and recombination of genetic material*; pp 157-174
W. J. Peacock u. J. D. Brock, eds.;
Australian Acad. Sci., Canberra
- Holliday, R. (1971) Biochemical measure of time and frequency of radiation induced allelic recombination in *Ustilago*.
Nature NB 232, 233-236

- Hotchkiss, R. D. (1974) Models of genetic recombination.
Ann. Rev. Microbiol. 28, 445-468
- Howard-Flanders, P. (1968) Genes that control DNA repair and genetic recombination in *E. coli*.
Adv. Biol. Med. Phys. 12, 299-317
- Howard-Flanders, P. (1968a) DNA repair.
Ann. Rev. Biochem. 37, 175-200
- Howard-Flanders, P. u. R. P. Boyce (1965) The repair of ultraviolet photoproducts in DNA of bacteria.
Cell. Radiat. Biol., pp 52-63, Williams and Wilkins Comp., Baltimore
- Howard-Flanders, P. u. R. P. Boyce (1966) DNA repair and genetic recombination: Studies on mutants of *Escherichia coli* defective in these processes.
Radiat. Res. Suppl. 6, 156-184
- Hunnable, E. G. u. B. S. Cox (1971) The genetic control of dark recombination in yeast.
Mutation Res. 13, 297-309
- Ishii, Y. u. S. Kondo (1972) Spontaneous and radiation-induced deletion mutations in *Escherichia coli* strains different in DNA repair capacities.
Mutation Res. 16, 13-25
- Jansen, G. J. O. (1970) Abnormal frequencies of spontaneous mitotic recombination in *uvrB* and *uvrC* mutants of *Aspergillus nidulans*.
Mutation Res. 10, 33-41
- Kanazir, D. T. (1969) Radiation-induced alterations in the structure of deoxyribonucleic acid.
Prog. Nucl. Acid Res. Molec. Biol. 9, 117-222
- Kanner, L. u. P. C. Hanawalt (1970) Repair deficiency in a bacterial mutant defective in DNA polymerase.
Biochim. Biophys. Res. Commun. 39 149-155
- Kelly, R. B., M. R. Atkinson, J. A. Humberman, A. Kornberg (1969) Excision of thymine dimers and other mismatched sequences by DNA polymerase of *E. coli*.
Nature 224, 495-501

- Köhnlein, W. u. F.
Mönkehaus (1972) Experimentelle Hinweise auf intramolekulare Energieleitung in der hybriden DNA von *Bacillus subtilis* nach Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht. Z. Naturforschg. 27b, 708-713
- Kössler, F. (1970) Ursachen der verschiedenen Strahlenempfindlichkeit und modifizierende Faktoren. Biol. Rundschau 8, 331-345
- Kondo, S. (1972) A theoretical study on spontaneous mutation rates. Mutation Res. 14, 365-374
- Kondo, S. (1973) Evidence that mutations are induced by errors in repair and replication. Genetics Suppl. 73, 109-122
- Kondo, S., H. Ichikawa, K. Iwo u. T. Kato (1970) Base-change mutagenesis and prophage induction in strains of *Escherichia coli* with different DNA repair capacities. Genetics 66, 187-217
- Konrad, E. B., P. Modrich u. I. R. Lehman (1973) Genetic and enzymatic characterization of a conditional lethal mutant of *Escherichia coli* K12 with a temperature sensitive DNA ligase. J. Mol. Biol. 77, 519-529
- Kowalski, S. (1971) Herstellung und Charakterisierung von auxotroph-strahlensensiblen *Saccharomyces*-Stämmen. Diplomarbeit, Freie Universität Berlin
- Kowalski, S. u. W. Laskowski (1975) The effect of three rad genes on survival, inter- and intragenic mitotic recombination in *Saccharomyces*. I. UV irradiation without photoreactivation or liquid-holding post-treatment. Molec. gen. Genet. 136, 75-86
- Kraeplin, G. (1967) Der Atmungsdefekt bei Hefezellen: eine kritische Betrachtung seiner Ursachen. I. Induktion und Reversibilität der "petite" Mutation. Z. Allg. Mikrobiol. 7, 287-325
- Lanier, W. B., R. W. Tuveson u. J. E. Lennox (1968) A radiation sensitive mutant of *Aspergillus nidulans*. Mutation Res. 5, 23-31

- Laskowski, W. (1960) Inaktivierungsversuche mit homozygoten Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades I. Aufbau homozygoter Stämme und Dosis-effektkurven für ionisierende Strahlen, UV und organische Peroxyde. Z. Naturforschg. 15b, 495-506
- Laskowski, W., E.-R. Lochmann, S. Jannsen u. E. Fink (1968) Zur Isolierung einer strahlensensiblen *Saccharomyces*-Mutante; Empfindlichkeit des Koloniebildungsvermögens, der RNS- und Proteinsynthese. Biophysik 4, 233-242
- Laskowski, W. u. E. Lehmann-Brauns (1973) Cross sensitivity to mono- and bifunctional alkylating agents of three radiation sensitive *Saccharomyces* mutants. Biophysik 10, 51-59
- Latarjet, R. (1972) Interaction of radiation energy with nucleic acids. Curr. Top. Radiat. Res. Quart. 8, 1-13
- Lawrence, C. W., J. W. Stewart, F. Sherman u. R. Christensen (1974) Specificity and frequency of ultraviolet-induced reversion of an iso-1-cytochrome c ochre mutant in radiation-sensitive strains of yeast. J. Mol. Biol. 85, 137-162
- Lawrence, C. W. (1974) Vortrag, gehalten auf der VII. International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (Brighton, Sussex)
- Lemontt, J. F. (1970) Genetic control of mutation induction in *Saccharomyces cerevisiae*. PhD Thesis, Lawrence Radiation Laboratory, University of California
- Lemontt, J. F. (1971a) Mutants of yeast defective in mutation induced by ultraviolet light. Genetics 68, 21-33
- Lemontt, J. F. (1971b) Pathways of ultraviolet mutability in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Some properties of double mutants involving *uvs9* and *rev*. Mutation Res. 13 311-317
- Lemontt, J. F. (1971c) II. The effect of *rev* genes on recombination. Mutation Res. 13, 319-326

- Lemontt, J. F. (1972) Induction of forward mutations in mutationally defective yeast.
Molec. gen Genet. 119, 27-42
- Luria, S. W. u. M. Delbrück (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance.
Genetics 28, 491-511
- Marsden, H. S., E. C. Pollard, W. Ginoza u. E. P. Randall (1974) Involvement of recA and exr genes in the in vivo inhibition of the recBC nuclease.
J. Bacteriol. 118, 465-470
- Mayer, V. W. (1969) Induction by UV-light of sectorized and non-sectorized petite mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.
Mutation Res. 9, 255-260
- Mc Clary, D. O., W. L. Nulthy u. G. R. Miller (1959) Effect of potassium versus sodium in the sporulation of *Saccharomyces*.
J. Bacteriol. 78, 362-368
- Meistrich, M. L. u. J. W. Drake (1972) Mutagenic effects of thymine dimers in bacteriophage T4.
J. Mol. Biol. 66, 107-114
- Meselson, M. (1972) Formation of hybrid DNA by rotary diffusion during genetic recombination.
J. Mol. Biol. 71, 795-798
- Meselson, M. u. C. M. Radding (1975) A general model for genetic recombination.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 72, 358-361
- Milcarek, C. u. B. Weiss (1972) Mutants of *Escherichia coli* with altered Deoxyribonucleases
I. Isolation and characterization of mutants for exonuclease III.
J. Mol. Biol. 68, 303-318
- Molineux, I.JJ. u. M. L. Gefter (1974) Properties of the DNA binding (unwinding) protein: Interaction with DNA polymerase and DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 71, 3858
- Moustacchi, E. (1969) Cytoplasmic and nuclear genetic events induced by UV-light in strains of *Saccharomyces cerevisiae* with different UV-sensitivities.
Mutation Res. 7, 171-185

- Moustacchi, E. (1971) Evidence for nucleaus independent steps in control of repair of mitochondrial damage.
I. UV-induction of the cytoplasmic "petite" mutation in UV-sensitive nuclear mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.
Molec. gen. Genet. 114, 50-58
- Parry, J. M. u. B. S. Cox (1968) The effects of dark holding and photo-reactivation on ultraviolet light-induced recombination and survival in yeast.
Genet. Res. Camb. 12, 187-198
- Parry, J. M. u. E. M. Parry (1969) The effects of UV-light posttreatments on the survival characteristics of 21 UV-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.
Mutation Res. 8, 545-556
- Parry, J. M. u. E. M. Parry (1972) The genetic implication of UV-light exposure and liquid holding posttreatment in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
Genet. Res. Camb. 19, 1-16
- Patrick, M. H., R. H. Haynes u. R. B. Uretz (1964) Dark recovery phenomena in yeast
I. Comparative effects with various inactivating agents.
Radiat. Res. 21, 144-163
- Patrick, M. H. u. R. H. Haynes (1964) Dark recovery phenomena in yeast
II. Conditions that modify the recovery process.
Radiat. Res. 23, 564-579
- Pauling, C. u. L. Hamm (1968) Properties of a temperature-sensitive radiation-sensitive mutant of *Escherichia coli*.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 60, 1495
- Pauling, C. u. L. Hamm (1969) Properties of a temperature-sensitive radiation-sensitive mutant of *E. coli*
II. DNA replication.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 64, 1195
- Pollard, E. C. u. T. F. Barone (1966) The effect of ionizing radiation on genetic transcription.
Radiat. Res. Suppl. 6, 194-200

- Radding, C. M. (1973) Molecular mechanisms in genetic recombination.
Ann. Rev. Genet. 7, 87-111
- Radding, C. M. u. E. Cassuto (1972) Enzymology of genetic recombination.
in: Advances in the Biosciences 8, 13-27
G. Raspé, ed., Pergamon Press-Vie-
weg, Oxford, New York, Braunschweig
- Radman, M., L. Cor-
done, D. Krsmanovic-
Simic, u. M. Errera
(1970) Complementary action of recombination
and excision in the repair of ultra-
violet irradiation damage to DNA.
J. Mol. Biol. 49, 205-212
- Radman, M., J. Romme-
laere u. M. Errera
(1973) Stability and evolution of DNA from the
point of view of molecular radiobiology.
in: Physico-chemical properties of nu-
cleic acids Vol.3, pp. 161-199;
J. Duchsne, ed., Academic Press
London
- Reichert, U. (1968) Gendosiswirkungen in einem tri- und te-
traploiden ad2-Mutantensystem von Saccha-
romyces und deren molekularbiologische
Bedeutung.
Dissertation, Freie Universität Berlin
- Resnick, M. A. (1968) Genetic control of lethality and muta-
tion in Saccharomyces cerevisiae.
PhD Thesis, Berkeley, California
- Resnick, M. A. (1969) A photoreactivationless mutant of
Saccharomyces cerevisiae.
Photochem. Photobiol. 2, 307-312
- Resnick, M. A. u. R.
Holliday (1971) Genetic repair and the synthesis of ni-
trate reductase in Ustilago maydis
after UV-irradiation.
Molec. gen. Genet. 111, 171-184
- Resnick, M. A. u. J. K.
Setlow (1972) Repair of pyrimidine dimer damage in-
duced in yeast by ultraviolet light.
J. Bacteriol. 109, 979-986
- Rodarte-Ramón, U. S.
u. R. K. Mortimer
(1972) Radiation-induced recombination in
Saccharomyces: Isolation and genetic
study of recombination-deficient mu-
tants.
Radiat. Res. 49, 133-147

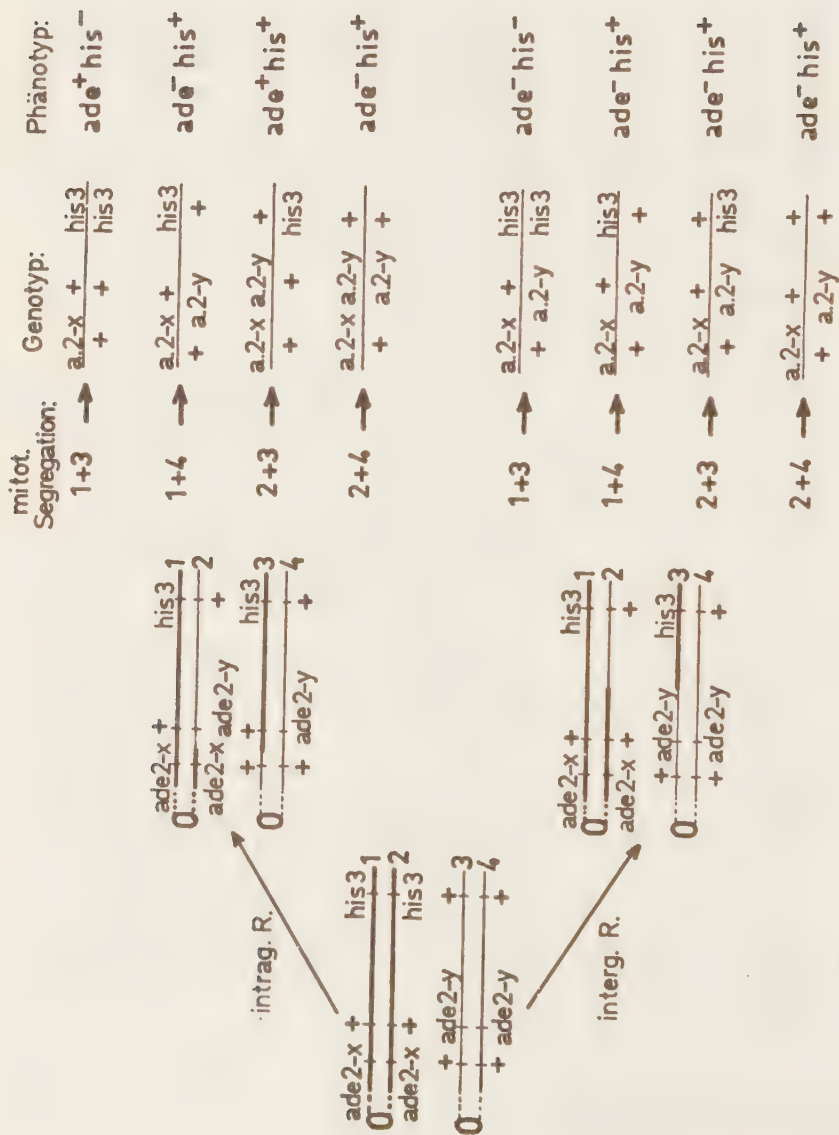
- Roman, H. (1956) A system selective for mutations affecting the synthesis of adenine in yeast.
Comp. Rend. Lab. Carlsberg., Sér. physiol. 26, 299-314
- Rosen, H. u. W. T. Ebersold (1972) Recombination in relation to ultraviolet sensitivity in *Chlamydomonas reinhardtii*.
Genetics 71, 247-253
- Rupert, C. S. u. W. Harm (1966) Reactivation of photobiological damage. in: *Advances in Radiation Biology* Vol. II, pp. 1-81, Academic Press, New York
- Schaarschmidt, B. (1970) Eine einfache Methode zur Bestimmung des Quantenflusses von Bestrahlungslampen im Wellenlängenbereich 2400A-6000A.
Z. Naturforschg. 25b, 330-331
- Schaarschmidt, B. (1972) Mikrokolorimetrische Untersuchungen zum Betriebsstoffwechsel UV-strahlensensibler Hefemutanten.
Dissertation, Freie Universität Berlin
- Schroeder, A. L. (1970) Ultraviolet-sensitive mutants of *Neurospora*
I. Genetic basis and effect on recombination.
Molec. gen. Genet. 107, 291-304
- Schroeder, A. L. (1974) Properties of a UV-sensitive *Neurospora* strain defective in pyrimidine dimer excision.
Mutation Res. 24, 9-16
- Schuster, H. (1969) Die molekularen Grundlagen der Photoaktivierung.
in: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 47, 46-68, Springer Verlag, Berlin
- Setlow, J. K. (1966) The molecular basis of biological effects of UV-irradiation and photoreactivation.
in: *Curr. Top. Radiat. Res.* 2, 196-248
M. Ebert u. A. Howard, eds., North Holland, Amsterdam
- Setlow, J. K. u. F. J. Bollum (1968) The minimum size of the substrate for yeast photoreactivating enzyme.
Biochim. Biophys. Acta 157, 233-237

- Setlow, P. u. A.
Kornberg (1972) Deoxyribonucleic acid polymerase: two distinct enzymes in one polypeptide. J. Biol. Chem. 247, 232-240
- Setlow, R. B., P. A.
Swenson u. W. L.
Carrier (1963) Thymine dimers and inhibition of DNA synthesis by UV-irradiation of cells. Science 142, 1464-1466
- Shanfield, B. u. E.
Käfer (1969) UV-sensitive mutants of increasing crossing over in *Aspergillus nidulans*. Mutation Res. 7, 485-487
- Sherman, F., J. W.
Stewart, M. Cravens,
F. L. X. Thomas u.
N. Shipman (1969) Different action of UV on a nonsense codon located at two different positions in the iso-1-cytochrome of yeast. Genetics 61, 55
- Sigal, N. u. B. M.
Alberts (1972) Genetic recombination: the nature of a crossed strand-exchange between two homologous DNA molecules. J. Mol. Biol. 71, 789-793
- Smirnov, G. B., E. V.
Filkova u. A. G.
Skavronskaya (1973) Loss and restoration of viability of *E. coli* due to combinations of mutations affecting DNA polymerase I and repair activities. Molec. gen. Genet. 121, 139-150
- Smith, K. C. (1966) Physical and chemical changes induced in nucleic acid by ultraviolet light. Radiat. Res. Suppl. 6, 54-79
- Smith, K. C. (1971) The role of genetic recombination and DNA polymerase in the repair of damaged DNA. in: Photophysiol. VI, pp 209-270; A. C. Giese, ed., Academic Press, New York
- Smith, K. C. u. P. C.
Hanawalt (1969) Molecular Photophysiology Academic Press, New York, London
- Smith, M. D., R. R.
Green, L. S. Ripley
u. J. W. Drake
(1973) Thymineless mutagenesis in bacteriophage T4. Genetics 74, 393-403
- Snow, R. (1967) Mutants of yeast sensitive to ultraviolet light. J. Bacteriol. 94, 571-575

- Sobell, H. M. (1973) Symmetry in Protein-nucleic acid interaction and its genetic implications. *Adv. Genetics.* 17, 411-490
- Sobell, H. M. (1974) Concerning the stereochemistry of strand equivalence in genetic recombination.
in: *Molecular Mechanisms in Genetic Recombination*, pp. 433-438; R. F. Grell, ed., Plenum Publ. Co. New York
- Storm, P. K. (1971) Recombination deficient mutants of *Escherichia coli* K12.
Dissertation, Rijksuniversiteit te Utrecht, Holland
- Strauss, B. S. (1968) DNA repair mechanisms and their relation to mutation and recombination.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 44, 1-85
- Umlauf, C., W. Stein, I. Pietsch u. E.-R. Lochmann (1970) Über Dunkelreaktivierung nach UV- oder Röntgenbestrahlung bei *Saccharomyces*: Der Einfluß der Zellkonzentration und die Wirkung von Dimethylsulfoxid und von verschiedenen Farbstoffen auf die Dunkelreaktivierung.
Biophysik 6, 275-279
- Unrau, P., R. Wheatcroft u. B. S. Cox (1971) The excision of pyrimidine dimers from DNA of ultraviolet-irradiated yeast.
Molec. gen. Genet. 113, 359-362
- Van Borstel, R. C. (1974) Vortrag gehalten auf der VII. International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (Brighton, Sussex)
- Varghese, A. J. (1972) Photochemistry of nucleic acids and their constituents.
in: *Photophysiology VII*, pp. 207-274, A. C. Giese, ed., Academic Press, New York
- Vologodskii, A. V., M. D. Frank-Kamenetsii u. A. V. Lukashin (1974) Theory of co-operative formation of defects in DNA molecule under ultraviolet irradiation.
J. theor. Biol. 44, 271-286
- Waters, R. u. E. Moustacchi (1974) The disappearance of ultraviolet-induced pyrimidine dimers from the nuclear DNA of exponential and stationary phase cells of *Saccharomyces cerevisiae* following various post-irradiation treatments.
Biochim. Biophys. Acta 353, 407-419

- Witkin, E. M. (1966) Mutation and the repair of radiation damage in bacteria. Radiat. Res. Suppl. 6, 30-53
- Witkin, E. M. (1967) Mutation-proof and mutation-prone modes of survival in derivatives of *E. coli* B differing in sensitivity to ultraviolet light. Brookhaven Symp. Biol. 20, 17-53
- Witkin, E. M. (1969) Ultraviolet-induced mutation and DNA repair. Ann. Rev. Genet. 3, 525-552
- Witkin, E. M. (1969a) The mutability toward ultraviolet light of recombination deficient strains of *E. coli*. Mutation Res. 8, 9-14
- Witkin, E. M. (1974) Thermal enhancement of ultraviolet mutability in a *tif-1* derivative of *Escherichia coli* B/r: evidence that mutagenesis depends upon an inducible function. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 71, 1930
- Witkin, E. M. u. D. L. George (1973) Ultraviolet mutagenesis in *polA* and *uvrApolA* derivatives of *Escherichia coli* B/r. Evidence for an inducible error-prone repair system. Genetics Suppl. 73, 91-108
- Yajko, D. M. u. B. Weiss (1975) Mutations simultaneously affecting endonuclease II and exonuclease III in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 72, 688
- Youngs, D. A., E. v.d. Schueren u. K. C. Smith (1974) Separate branches of the *uvr* gene-dependent excision repair process in ultraviolet-irradiated *Escherichia coli* K-12 cells; their dependence upon growth medium and the *polA*, *recA*, *recB*, and *exrA* genes. J. Bacteriol. 117, 717-725
- Zakharov, T. A., T. N. Kozina u. T. V. Federova (1970) Effects des mutations vers la sensibilité au rayonnement ultraviolet chez la levure. Mutation Res. 9, 31-39

ANHANG: Schema der mitotischen Rekombination



Die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit bauten auf meiner Diplomarbeit auf. Für das Thema, den Arbeitsplatz und zahlreiche anregende Diskussionen bin ich Herrn Prof. Dr. W. Laskowski sehr zu Dank verpflichtet. Auch möchte ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken, die diese Arbeit in großzügiger Weise finanziell unterstützte.

Viele Mitglieder des Instituts haben mit hilfreichen Gesprächen und Diskussionen den Fortgang der Arbeit unterstützt. Herzlich danke ich besonders Herrn Dr. I. Lamprecht und Herrn Dr. B. Schaarschmidt für Hilfe in mathematischen und physikalischen Fragen, sowie Frau M. Brose, die unzählige Platten für die großen Versuche goß und sich um die technischen Vorbereitungen sorgte.

Auch danke ich Herrn Prof. Dr. S. Fogel und Herrn Prof. Dr. N. Symonds, durch die ich anlässlich einer Tagung in Aviemore viele Anregungen erhielt.

Für die ständige Hilfsbereitschaft und die vielen kritischen, anregenden Gespräche gilt mein besonderer Dank Frä. Dr. F. Eckardt und Herrn A. Yasui, die mir auch noch nicht veröffentlichte Ergebnisse für die Diskussion zur Verfügung stellten.

Am 31. 5. 1947 wurde ich als Tochter des Lehrerehepaares Walter und Freya (geb. Schettler) Eisenbeis in Leipzig-Connewitz geboren.

Im Herbst 1947 flüchteten wir nach Kamp Lintfort/Krs. Moers und wanderten im Januar 1953 nach Kanada aus. Im März 1953 wurde ich dann in New Hamburg/Ontario eingeschult. Die Volksschule besuchte ich 1953-1955 in New Hamburg, 1955-1956 in Waterloo/Ontario, 1956-1957 in Thessalon/Ontario, 1957-1960 in Chicago/Illinois. Dort besuchte ich anschliessend die High School (1960-1961). Das High School Diploma erhielt ich in Granville, Ohio, wo ich 1961-1964 die restlichen Jahre der High School absolvierte.

Im Herbst 1964 wurde ich an der Denison University in Granville, Ohio immatrikuliert. Das zweijährige Studium an diesem College wurde mir in Zusammenhang mit dem High School Diploma vom Senator für Schulwesen in Berlin als Äquivalent zur deutschen Reifeprüfung anerkannt.

Im WS 1966/67 begann ich mit dem Biologiestudium an der Freien Universität Berlin. Die Vordiplomprüfung in Biologie bestand ich im SS 1969, die Diplomhauptprüfung im SS 1971. Die Experimente der Diplomarbeit wurden unter Prof. Dr. W. Laskowski im Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik durchgeführt.

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 1971 bis März 1974 unter Prof. Laskowski im Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik durchgeführt. In dieser Zeit war ich als wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Prof. Laskowski angestellt; die Arbeit wurde aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziert.

Seit dem 1.10.1974 bin ich als wissenschaftliche Assistentin im Institut für Gärungsgewerbe, Abteilung Prof. Dr. S. Winisch, angestellt.

Am 9.6.1971 heiratete ich den Diplombiologen Wolfgang Kowalski.

Druck: W. Hilke KG, Berlin 30, Motzstr. 64

Druck: V. Hilde AG, Berlin 30, Motzstr. 64

